



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP**

Laryssa Vanessa de Liz

**ANÁLISE *IN SILICO* DE PROTEÍNAS DA ZONA DE ADESÃO
FLAGELAR E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA
GLICOPROTEÍNA DE ADESÃO FLAGELAR 3 (FLA3) DE
Trypanosoma rangeli E DE *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Liz, Laryssa Vanessa

Análise in silico de proteínas da zona de adesão
flagelar e caracterização molecular da glicoproteína
de adesão flagelar 3 (Fla3) de *Trypanosoma rangeli*
e de *Trypanosoma cruzi* / Laryssa Vanessa de Liz ;
orientador, Edmundo Carlos Grisard, coorientador,
Patrícia Hermes Stoco, 2017.

106 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Flagelo. 3. FAZ. 4.
Trypanosomatidae. I. Grisard, Edmundo Carlos . II.
Hermes Stoco, Patrícia. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV.
Título.

Laryssa Vanessa de Liz

**ANÁLISE *IN SILICO* DE PROTEÍNAS DA ZONA DE ADESÃO
FLAGELAR E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA
GLICOPROTEÍNA DE ADESÃO FLAGELAR 3 (FLA3) DE
Trypanosoma rangeli E DE *Trypanosoma cruzi***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado à disciplina
BIO7016 - Trabalho de Conclusão de Curso II, para a obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Centro de Ciências
Biológicas da UFSC.

Florianópolis, 17 de julho de 2017.

Prof. Carlos Roberto Zanetti

Dr. Coordenador do Curso

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Dr. Orientador

UFSC

Prof^a. Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

Coorientadora

UFSC

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

UFSC

Prof^a. Dr^a. Yara Costa Netto
Muniz

UFSC

Este trabalho é dedicado
aos meus pais, Silvio e
Francisca, aos meus
irmãos, William e Maria, e
a minha avó, Marcolina,
em memória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard. Eu conheci você na primeira fase do curso e, já naquela época, fiquei admirada pelo seu trabalho e caráter. Sou muito grata pela oportunidade de trabalhar na PROTO e por todo o incentivo e apoio que você me deu desde o início. Este trabalho não seria sobre um tema que eu gosto tanto se não fosse por você. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pelos cafés nos dias que consegui chegar cedo no lab.

À minha orientadora, Dr^a Patrícia Hermes Stoco, por todo o aprendizado e todas as vezes que você veio me socorrer. Pati, você é um exemplo a ser seguido. Sou muito agradecida por ter tido a oportunidade de ter você por perto e aprender tantas coisas nesses últimos anos, assim como agradeço por todas as vezes que você fez meu dia mais feliz ao trazer comida pro lab.

Aos meus pais, Silvio e Francisca. Vocês dois são a base de quem eu sou e com certeza eu não estaria aqui sem vocês. Eu agradeço imensamente a todo o apoio que vocês dois me deram desde que eu nasci, sempre me estimulando a estudar e correr atrás do que eu queria. Sou muito grata por ter pais tão maravilhosos, que apesar de tudo me amam e estão sempre dispostos a me ouvir. Faltam-me palavras para descrever o quanto eu amo vocês.

Aos meus irmãos, William e Maria, que são as duas coisas mais preciosas da minha vida. Maninho, obrigada por ser esta pessoa maravilhosa e compreensível, e Maria, obrigada por existir e me fazer feliz todas as vezes que te ouço rir pelo telefone.

Aos meus avós, Marcolina (em memória), Emílio, Vitor e Dolores, que são fonte de inspiração e forças para mim, e que com certeza passaram cinco anos se preocupando com a minha segurança.

Ao meu amor, Larissa, por ter me conhecido na época mais louca da minha vida e ter aguentado do meu lado esse tempo, ajudando-me a passar por isso sem sofrer tanto. Eu te amo!

Às minhas companheiras de casa, Kelly e Nati. Kelly, você é como uma irmã pra mim. Eu agradeço muito mesmo por todos os momentos, todas as cervejas, as comidas e as milhões de vezes que tentamos assistir HP, mas eu acabei dormindo. Nati, você é nosso filhote, mas é como uma filha pra mim. Obrigada

por ser um exemplo de pessoa forte e por todas as vezes que você me ajudou, principalmente no lab.

À Carime, minha segunda mãe, obrigada pela nossa amizade e por todas as vezes que você me socorreu no laboratório, no TCC e na vida, inclusive salvando o meu natal. Obrigada por tudo, você é incrível, e eu estarei aqui sempre que você precisar de ajuda para um teste enzimático ou na limpeza de um fogão.

À Milene, que foi fundamental para o começo da minha iniciação científica e que, além de todo o ensinamento científico, sempre me estimula a enfrentar o que deve ser enfrentado e não baixar a cabeça.

Aos demais integrantes da PROTO, Professor Mário, Professor Glauber, Ana, Lucas, Adri, Abadio, Tati, Carol e Júlia, obrigada por todas as risadas e aprendizados, e em especial ao Bruno, por me ouvir desabafar inúmeras vezes e sempre aceitar dividir uma cerveja e batata-frita.

A todos os meus amigos de graduação, de infância e de intercâmbio, em especial Manuela, Jéssica, Maiara, Kauan, Fernanda, Sara, Bárbara e Rogério, obrigada por toda a amizade.

A todos os meus professores, que de alguma forma contribuíram para a minha formação nestes anos de ensino.

Aos membros da banca avaliadora, por terem aceitado o convite e pela disposição de contribuir para este trabalho.

Ao CPNq, FINEP, CAPES e UFSC pelo incentivo financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer ao Programa Ciências sem Fronteiras, o qual me fez amadurecer muito como pessoa e como estudante. Sem esta oportunidade, este TCC não existiria.

RESUMO

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* possuem um único flagelo que emerge da bolsa flagelar e é aderido ao longo do corpo do parasito via zona de adesão flagelar (FAZ), sendo a extremidade do flagelo livre. A adesão é importante para a divisão celular, motilidade e infectividade do parasito. A FAZ de *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono no continente africano, é composta de ao menos 30 proteínas. Uma dessas é a Glicoproteína de Adesão Flagelar 3 (Fla3), proteína estágio específica expressa nas formas de corrente sanguínea do parasito. Diferente de *T. brucei*, pouco se sabe sobre a FAZ de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Este trabalho teve como objetivo realizar a busca de proteínas ortólogas as proteínas da FAZ de *T. brucei* em *T. cruzi* e *T. rangeli* e caracterizar molecularmente a Fla3 destes dois parasitos. As sequências de 30 proteínas descritas na FAZ de *T. brucei* foram utilizadas para a busca de sequências ortólogas em *T. cruzi* e *T. rangeli*. Foram encontradas 25 proteínas ortólogas em ambas as espécies, o que indica uma redução no número de proteínas da FAZ. A sequência ortóloga a Fla3 em *T. cruzi* (*TcFla3*) e *T. rangeli* (*TrFla3*) é a mesma encontrada como ortóloga de outra proteína, Fla1BP, sendo esta expressa nas formas procíclicas de *T. brucei*. A *TrFla3* é um gene de 2.214 pb, que corresponde a uma proteína de 737 aminoácidos com peso molecular previsto de 80,5 kDa. Visando a expressão heteróloga, a *TrFla3* foi subclonada em vetor de expressão, que foi utilizado para transformar as linhagens bacterianas BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus, BL21 (DE3) Rosetta e BL21 (DE3) pLysS com diferentes tempos e temperaturas de indução. Como não foi possível a expressão da ORF da *TrFla3* nas condições testadas, um fragmento (*TrFla3* Frag2) foi expresso na linhagem BL21 (DE3) Codon Plus. Este fragmento foi purificado e utilizado para a imunização de camundongos, sendo o soro obtido capaz de reconhecer o fragmento proteico recombinante (~ 24,67 kDa) e duas bandas de aproximadamente 100 e 250 kDa nos extratos de tripomastigotas e epimastigotas das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli*. Dessa forma, a *TrFla3*, ao contrário da *TbFla3*, não é estágio específica. Nenhuma proteína foi reconhecida nos extratos de tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e promastigotas de *Leishmania infantum*, sugerindo que o antissoro anti-*TrFla3* produzido é espécie específico. A diferença de peso molecular esperado (80,5 kDa) e observado (100 kDa) pode estar relacionada as modificações de glicosilação sofridas pós-

tradução. Quanto a *TcFla3*, foi possível apenas a amplificação da ORF da cepa Y, que corresponde a um gene de 2.136 pb e a uma proteína de 712 aminoácidos com peso molecular de 79,73 kDa. Como não houve reconhecimento de anticorpos anti-*TrFla3_Frag2* da *TrFla3*, fragmentos proteicos recombinantes da *TcFla3* serão produzidos a fim de gerar anticorpos específicos. Ainda será necessário a realização de estudos de citolocalização e níveis de expressão para verificar se a Fla3 dessas duas espécies manteve as características da *TbFla3*.

Palavras-chave: Flagelo. FAZ. Trypanosomatidae.

ABSTRACT

The protozoa from the genus *Trypanosoma* possess a single flagellum which emerges from the flagellar pocket and it is attached to the cell body through the flagellar attachment zone (FAZ), being the extremity tip free. This adhesion is significant for cell division, motility and infectivity of the parasite. The FAZ from *Trypanosoma brucei*, etiological agent of the sleeping illness in the african continent, is composed of at least 30 proteins. One of them is the Flagellar Glycoprotein 3 (Fla3), which is a stage-specific protein expressed in the bloodstream forms. Meanwhile, little is known about the FAZ from *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. This study aims to search for orthologous proteins of FAZ proteins from *T. brucei* in *T. cruzi* and *T. rangeli*, and characterize the Fla3 from both parasites. The sequences from 30 FAZ proteins from *T. brucei* were used for searching orthologous sequences in *T. cruzi* e *T. rangeli*. We found 25 orthologous in each species, which indicates a reduction of the number of FAZ proteins in both of them. The orthologous sequence of Fla3 in *T. cruzi* e *T. rangeli* is also found as orthologous of another protein, Fla1BP, which is expressed in the procyclic forms of *T. brucei*. Fla3 from *T. rangeli* (*Tr*Fla3) is a gene of 2214 bp, which corresponds to a protein of 737 amino acids and a predicted molecular weight of 80,5 kDa. Aiming heterologous expression, *Tr*Fla3 was sub cloned in expression vector, which was used to transform the bacteria lineages BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codon Plus, BL21 (DE3) Rosetta and BL21 (DE3) pLysS with different times and temperatures of induction. As it was not possible to express *Tr*Fla3 ORF under the tested conditions, a fragment (*Tr*Fla3_Frag2) was expressed in the lineage BL21 (DE3) Codon Plus. This recombinant fragment was purified and used to immunize mice. The serum containing antibodies anti-*Tr*Fla3_Frag2 was collected, and those antibodies recognized the recombinant peptide (approximately 24.76 kDa) and two other bands of approximately 100 and 250 kDa in the extracts of trypomastigotes and epimastigotes of Choachí and SC58 strains (*T. rangeli*), but it did not recognize *T. cruzi* neither *Leishmania infantum*. Therefore, the antibodies anti-*Tr*Fla3_Frag2 are species-specific. The *Tr*Fla3, unlike *Tb*Fla3, is not stage-specific. The difference between expected and observed molecular weight may be related to post-translational glycosylation. Regarding Fla3 from *T. cruzi* (*Tc*Fla3), we could only amplify the ORF from Y strain, which corresponds to a gene of 2136 bp and a protein of

712 amino acids with molecular weight of 79.73 kDa. Once antibodies anti-*Tr*Fla3_Frag2 did not recognize *Tc*Fla3, recombinant fragments of this protein will be produced with the purpose of producing specific antibodies anti-*Tc*Fla3. It will be necessary to realize studies of cytolocalization and expression levels to verify if Fla3 from both species still have the characteristics of *Tb*Fla3.

Key-words: Flagellum. FAZ. Trypanosomatidae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma rangeli</i>	23
Figura 3 - Morfologia das formas epimastigotas e tripomastigotas do gênero <i>Trypanosoma</i>	24
Figura 4 - Organização da zona de adesão flagelar no gênero <i>Trypanosoma</i>	25
Figura 5 - Modelo de interação entre Fla1 e Fla1BP de <i>Trypanosoma brucei</i>	27
Figura 6 - Amplificação via PCR da <i>TrFla3</i> a partir de DNA genômico da cepa Choachí de <i>Trypanosoma rangeli</i>	48
Figura 7 - Amplificação via PCR de <i>TrFla3</i> a partir de DNA genômico das cepas Choachí e SC58 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	49
Figura 8 - Alinhamento da <i>TrFla3</i> das cepas Choachí e SC58 de <i>Trypanosoma rangeli</i> com a sequência aminoácídica da Fla3 de <i>Trypanosoma brucei</i>	50
Figura 9 - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	51
Figura 10 - Avaliação da expressão da <i>TrFla3</i> recombinante por <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3.....	52
Figura 11 - Representação esquemática dos fragmentos da Fla3 de <i>T. rangeli</i> escolhidos para expressão heteróloga.....	54
Figura 12 - Amplificação via PCR de <i>TrFla3_Frag1</i> e <i>TrFla3_Frag2</i> a partir de DNA genômico das cepas Choachí e SC58 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	54
Figura 13 - Amplificação via PCR diretamente das colônias dos fragmentos <i>TrFla3_Frag1</i> e <i>TrFla3_Frag2</i> submetidos a clonagem no vetor de expressão pET14b.....	55
Figura 14 - Análise da expressão heteróloga do fragmento proteico <i>TrFla3_Frag2</i> da cepa SC58 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	56
Figura 15 - Purificação da <i>TrFla3_Frag2</i> recombinante.....	57
Figura 16 - Avaliação do antissoro anti- <i>TrFla3</i>	58
Figura 17 - Avaliação da expressão da Fla3 em extratos proteicos de <i>Trypanosoma rangeli</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i>	58
Figura 18 - Amplificação via PCR da <i>TcFla3</i> a partir de DNA genômico das cepas Colombiana e Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Figura 19 - Teste para a amplificação via PCR da <i>TcFla3</i> a partir de DNA genômico das cepas Colombiana e Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60

Figura 20 - Amplificação via PCR diretamente das colônias da <i>TcFla3</i> após clonagem em pGEM-T easy.....	61
Figura 21 - Alinhamento da <i>TcFla3</i> das cepas Y e CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> com a sequência aminoacídica da Fla3 de <i>Trypanosoma brucei</i>	62
Figura 22 - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
Figura 23 - Representação esquemática dos fragmentos da Fla3 de <i>T. cruzi</i> escolhidos para expressão heteróloga.....	63
Figura 24 - Amplificação via PCR dos fragmentos <i>TcFla3_Frag1</i> e <i>TcFla3_Frag2</i> do gene Fla3 das cepas Colombiana e Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Figura 23 - Amplificação via PCR diretamente das colônias dos fragmentos <i>TcFla3_Frag1</i> e <i>TcFla3_Frag2</i> após clonagem em pGEM-T easy.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Desenho de iniciadores visando a amplificação da Fla3 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcFla3) e <i>Trypanosoma rangeli</i> (TrFla3).....	32
Quadro 2 - Antibióticos utilizados para seleção de bactérias transformadas em função de cada linhagem utilizada.....	37
Quadro 3 - Proteínas da FAZ em <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	42
Quadro 4 - Número de códons raros na sequência do gene Fla3 de <i>T. rangeli</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma
µl – microlitro
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
°C – graus Celsius
CDD – do inglês *Conserved Domain Database*
CIBio – Comissão Interna de Biossegurança
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
D.O. – densidade óptica
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EL – híbrido Esmeraldo-Like da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*
FAZ – zona de adesão flagelar (do inglês *Flagellar Attachment Zone*)
FFD – proteínas da FAZ do Flagelo
FFID – proteínas do filamento FAZ
FID – proteínas da FAZ com porções intracelulares
g – força da gravidade
h – horas
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa – kilodalton
LB – meio Luria Bertani
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*
min – minutos
ml – mililitro
mM – milimolar
MTQ – quarteto de microtúbulos
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NEL – híbrido Esmeraldo-Like da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*
ng – nanograma
nm – nanômetro
ORF – quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PFR – haste paraflagelar (do inglês *paraflagellar rod*)
pH – potencial hidrogeniônico
PVDF – fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Fluoride*)

rpm – rotações por minuto

RPS-BLAST (*Reverse Position-Specific BLAST*)

SBF – soro bovino fetal

SDS – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE – do inglês *Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SIAS – do inglês *Sequence Identity And Similarity*

TbFla3 – glicoproteína de adesão flagelar de *T. brucei*

TcFla3 – glicoproteína de adesão flagelar de *T. cruzi*

TrFla3 – glicoproteína de adesão flagelar de *T. rangeli*

U – unidade

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	GÊNERO <i>TRYPANOSOMA</i>	21
1.2	ZONA DE ADESÃO FLAGELAR (FAZ).....	24
1.3	OBJETIVOS.....	28
1.3.1	Objetivo geral.....	28
1.3.2	Objetivos específicos.....	28
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	29
2.2	CULTIVO DE PARASITOS.....	30
2.3	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DA FLA3.....	31
2.3.1	Desenho de iniciadores para amplificação da <i>TcFla3</i> e <i>TrFla3</i> via PCR.....	31
2.3.2	Extração do DNA genômico.....	33
2.3.3	Amplificação via PCR e clonagem da <i>Fla3</i>	33
2.3.4	Sequenciamento dos insertos clonados.....	35
2.3.5	Subclonagem em vetor de expressão.....	35
2.3.6	Verificação da clonagem em vetores de expressão....	36
2.4	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA <i>TrFla3</i> E <i>TrFla3</i> _Frag2.....	36
2.4.1	Transformação das bactérias competentes.....	36
2.4.2	Expressão heteróloga de proteínas e fragmentos proteicos recombinantes.....	37
2.4.3	Teste de solubilidade dos fragmentos proteicos recombinantes.....	39
2.4.4	Purificação da proteína recombinante.....	39
2.5	OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL ANTI- <i>TrFla3</i> _Frag2.....	40
2.5.1	Animais e aspectos éticos.....	40
2.5.2	Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro.....	40
2.6	ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DO ANTÍSSORO ANTI- <i>TrFla3</i> _Frag2 ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIPANOSOMATÍDEOS.....	41
3.	RESULTADOS.....	42
3.1	PROTEÍNAS CONSTITUINTES DA FAZ DE <i>T. cruzi</i> E DE <i>T. rangeli</i>	42
3.2	FLA3 DE <i>T. cruzi</i> E <i>T. rangeli</i>	47
3.2.1	Amplificação, clonagem e análise da sequência <i>Fla3</i> de <i>T. rangeli</i>	47
3.2.2	Expressão heteróloga da <i>Fla3</i> de <i>T. rangeli</i>	52

3.2.3	Amplificação e clonagem de fragmentos da Fla3 de <i>T. rangeli</i>	53
3.2.4	Expressão heteróloga e purificação da TrFla3_Frag2 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	55
3.2.5	Produção e avaliação de antissoro policlonal anti-TrFla3.....	57
3.2.6	Amplificação, clonagem e análise da sequência do gene da Fla3 de <i>T. cruzi</i>	58
4.	DISCUSSÃO.....	67
4.1	FLA3 DE <i>T. rangeli</i>	69
4.2	FLA3 DE <i>T. cruzi</i>	72
5.	CONCLUSÕES.....	75
6.	PERSPECTIVAS.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	Apêndice A - Proteínas da FAZ de <i>Trypanosoma brucei</i>	84
	Apêndice B - Proteínas da FAZ de <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
	Apêndice C – Proteínas da FAZ de <i>Trypanosoma rangeli</i>	98
	Apêndice D – Predição dos sítios de glicosilação de TcFla3, TrFla3, TbFla3 e TbFla1BP.....	103
	Apêndice E - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de <i>Trypanosoma brucei</i>	105
	Apêndice F - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla1BP de <i>Trypanosoma brucei</i>	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *TRYPANOSOMA*

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* são protozoários hemoflagelados capazes de infectar uma ampla variedade de organismos, de plantas a mamíferos. Dentre as espécies patogênicas do gênero que infectam seres humanos estão o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), agente etiológico da Doença de Chagas nas Américas, e o *Trypanosoma brucei* (PLIMMER; BRADFORD, 1899), agente etiológico da Doença do Sono no continente Africano. Além desses, ocorre nas Américas o *Trypanosoma rangeli* (TEJERA, 1920), porém este parasito é considerado não patogênico para seus hospedeiros mamíferos, mas sim para os insetos vetores, especialmente do gênero *Rhodnius* (ÁÑEZ; EAST, 1984; D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992).

As espécies *T. cruzi* e *T. rangeli* são capazes de infectar diversas espécies de triatomíneos vetores e reservatórios mamíferos, incluindo seres humanos (CUBA CUBA, 1998; D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992; GRISARD et al., 1999; GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; GUHL; VALLEJO, 2003; VALLEJO; GUHL; SCHAU, 2009; VASQUEZ et al., 2004), o que resulta na sua distribuição geográfica sobreposta (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999). Além disso, o *T. rangeli*, embora não patogênico para o ser humano, é capaz de induzir neste uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos que apresentam reatividade cruzada com antígenos de *T. cruzi*, o que pode ser explicado pelo compartilhamento nas formas epimastigotas de grande parte da constituição antigênica solúvel destes dois parasitos (AFCHAIN et al., 1979; MORAES et al., 2008). A sobreposição da distribuição dos dois parasitos e a reatividade cruzada prejudicam o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, possibilitando diagnósticos falso-positivos. Isso torna o *T. rangeli* um parasito importante quanto aos estudos epidemiológicos da doença de Chagas (D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992; GRISARD et al., 1999).

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 1), o triatomíneo é infectado durante o repasse sanguíneo ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas do parasito que se encontram livres no sangue. Uma vez ingeridos, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas, capazes de se multiplicar por divisão binária no intestino posterior do inseto. No reto do inseto, as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas, e são então eliminadas pelas fezes do triatomíneo

durante a alimentação do inseto. As formas tripomastigotas metacíclicas alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero através de soluções de continuidade na derme ou através de mucosas e penetram suas células, onde passam pelo processo de diferenciação para formas amastigotas. Essas passam a se multiplicar e diferenciam-se em tripomastigotas antes do rompimento da célula, quando são liberadas na circulação do hospedeiro vertebrado. Uma vez livres na corrente sanguínea, os parasitos podem ser ingeridos por um novo triatomíneo, completando o ciclo, ou penetrar em novas células (DE LANA; TAFURI, 2002).

Figura 1 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

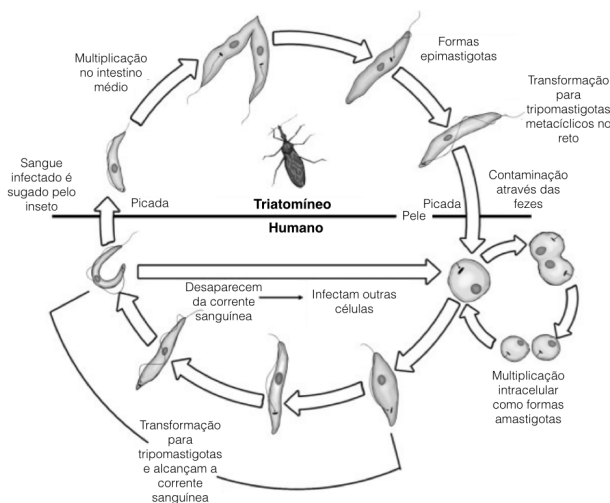
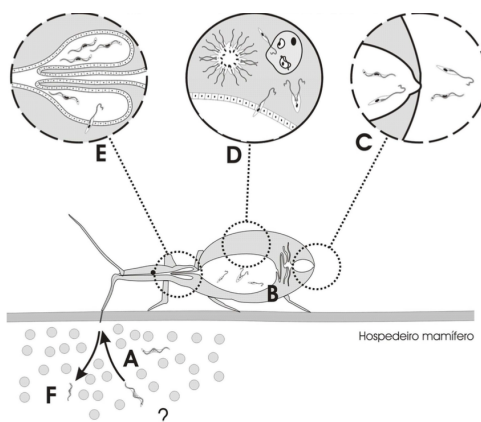


Ilustração adaptada de BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013.

O ciclo de vida do *T. rangeli* possui algumas características distintas do ciclo de *T. cruzi*, tanto no hospedeiro invertebrado quanto no vertebrado (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, os triatomíneos são infectados pela ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas do parasito, que se diferenciam em formas epimastigotas no intestino, as quais se multiplicam e aderem e atravessam o epitélio intestinal, alcançando a hemocele. Na hemolinfa, os epimastigotas se multiplicam e invadem as glândulas salivares, onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas.

Diferentemente da transmissão do *T. cruzi*, as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. rangeli* são inoculadas através da picada do inseto durante o repasto sanguíneo sendo, portanto, uma transmissão inoculativa (GRISARD; STEINDEL, 2002). O ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado ainda é pouco elucidado, sendo relatadas parasitemias normalmente muito baixas e de curta duração. Entretanto, foi descrita uma parasitemia sete vezes maior de *T. rangeli* do que o inóculo aplicado em camundongos, o que pode indicar multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985). O *T. rangeli*, embora esteja filogeneticamente mais próximo ao *T. cruzi*, apresenta características fenotípicas relacionadas ao *T. brucei*, como a transmissão através da inoculação. Face a isso, diferentes estudos inferem que o *T. rangeli* possa ter uma replicação extracelular no hospedeiro mamífero semelhante ao *T. brucei* (BASTIN et al., 2000; STOCO et al., 2014).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli*. A) Ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo. B) Formas epimastigotas no intestino do inseto. C) Alguns parasitos alcançam a ampola retal, onde podem ser excretados. D) Epimastigotas alcançam a hemocele, onde passam a se multiplicar. E) Parasitos penetram glândulas salivares, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos. F) Inoculação dos parasitos durante o repasto sanguíneo.



Apesar da plasticidade genômica dos parasitos do gênero *Trypanosoma*, a morfologia das formas epimastigotas e tripomastigotas pode ser bem evidenciada (Figura 3). Durante todo o ciclo de vida desses parasitos, é sempre possível observar o núcleo e o cinetoplasto, uma região modificada da mitocôndria rica em DNA posicionada usualmente próxima à região emergente do flagelo. As formas tripomastigotas são alongadas, com um flagelo que emerge na porção posterior da célula, possuindo, portanto, um cinetoplasto posterior ao núcleo. Por outro lado, nas formas epimastigotas o flagelo emerge na porção anterior, possuindo assim um cinetoplasto localizado de forma anterior ao núcleo. Nessas duas formas, o flagelo emerge de uma região chamada bolsa flagelar, possuindo parte aderida ao longo do corpo celular e uma extremidade livre na porção anterior da célula (SUNTER; GULL, 2016; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

Figura 3 - Morfologia das formas epimastigotas e tripomastigotas do gênero *Trypanosoma*. Ilustração das formas tripomastigotas (A) e epimastigotas (B) do gênero *Trypanosoma*. Formas tripomastigotas (C) e epimastigotas (D) de *Trypanosoma cruzi* coradas pelo método de Giemsa.

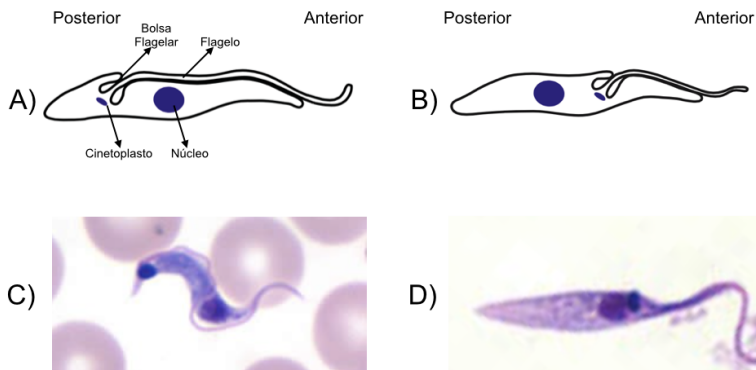


Ilustração adaptada de Sunter e Gull (2016). Fonte das fotos: CDC (<https://www.cdc.gov>).

1.2 ZONA DE ADESÃO FLAGELAR (FAZ)

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* possuem um único flagelo, o qual é importante não apenas na motilidade celular, mas também na interação do parasito com os hospedeiros, uma vez que a invasão das células dos hospedeiros, bem como a adesão a superfície de tecidos, são dependentes de interação via flagelo (BASTIN et al., 2000). Além disso, o flagelo é fundamental para a divisão celular dos parasitos (ZHOU; HU; LI, 2014). Esse possui um axonema central com organização 9+2, onde 9 pares de microtúbulos estão arranjados em círculo e 1 par se encontra no centro (Figura 4). Em paralelo ao axonema, corre uma estrutura chamada haste paraflagelar (PFR). Ambas as estruturas estão presentes ao longo de todo o flagelo, que emerge do corpo celular por uma estrutura chamada bolsa flagelar. A bolsa flagelar é uma invaginação da membrana celular e tem papel importante na endocitose e secreção (LANGOUSIS; HILL, 2014).

Figura 4 - Organização da zona de adesão flagelar no gênero *Trypanosoma*. A) Ilustração dos componentes principais do corpo celular do gênero *Trypanosoma*. A área em vermelho indica a região da zona de adesão flagelar. O tracejado indica o corte transversal correspondente a (B). B) Microscopia eletrônica de transmissão do corte transversal da região do flagelo, indicando o axonema, haste paraflagelar (PFR), domínio FAZ flagelar (FFD, zonas 1 e 2), domínio FAZ intracelular (FID, zonas 2, 3 e 4), domínio do filamento FAZ (FFID, zonas 4, 5 e 6) e quarteto de microtúbulos (zonas 7 e 8).

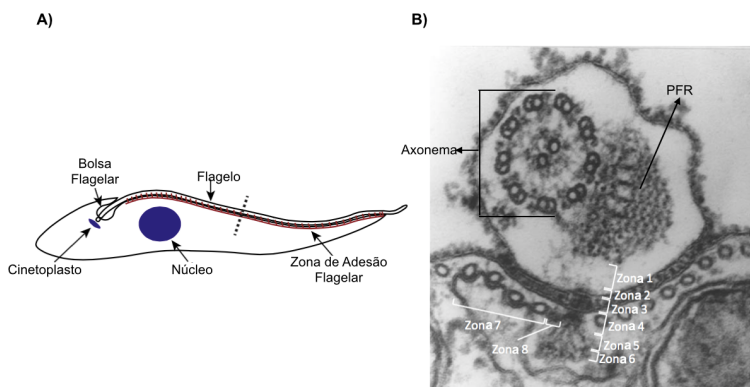


Ilustração adaptada de Sunter e Gull (2016).

Após emergir pela bolsa flagelar, o flagelo é aderido lateralmente ao longo de todo o corpo celular, tendo apenas a ponta distal livre. Essa adesão é mediada por uma região chamada de zona de adesão flagelar (FAZ, do inglês *Flagellar Attachment Zone*), onde a membrana do flagelo apresenta diversas junções com a membrana da célula ao longo de toda região de adesão (BASTIN et al., 2000). Também fazem parte da FAZ um filamento FAZ e um quarteto de microtúbulos (MTQ), ambos localizados logo abaixo da membrana plasmática celular e em paralelo ao flagelo. Ademais, a correta adesão do flagelo ao corpo celular é essencial para a manutenção da morfologia do parasito, sendo que alterações induzidas na FAZ são capazes de alterar a morfologia, impedir a citocinese e diminuir a viabilidade do parasito (LANGOUSIS; HILL, 2014; SUNTER; GULL, 2016).

A FAZ é formada por uma complexa interação entre diferentes proteínas da membrana celular, do citoesqueleto e do flagelo. A primeira proteína do complexo FAZ descrita foi a Gp72 (SNARY et al., 1981), uma glicoproteína de *T. cruzi* cujo gene foi posteriormente caracterizado por Cooper et al. (1991). A deleção do gene da Gp72 determina defeitos na adesão flagelar (COOPER; DE JESUS; CROSS, 1993) e diminui a infectividade de *T. cruzi* para camundongos e insetos vetores (BASOMBRIO et al., 2002), o que evidencia a importância da proteína e da manutenção da FAZ para o ciclo de vida do parasito. Em 1996, foi descrito em *T. brucei* uma proteína homóloga à Gp72, chamada de Glicoproteína de Adesão Flagelar 1 - Fla1 (do inglês *Flagellar-Adhesion glycoprotein 1*), expressa nas formas procíclicas do parasito (NOZAKI; HAYNES; CROSS, 1996). Em seguida, outros dois genes com alta identidade em relação à Fla1 foram identificados no *T. brucei*, e estes foram chamados de Fla2 (Glicoproteína de Adesão Flagelar 2) e Fla3 (Glicoproteína de Adesão Flagelar 3) (SUN et al., 2013; SUNTER; GULL, 2016).

Através de ensaios de imunoprecipitação da Fla1, Sun et al. (2013) identificaram uma nova proteína, a Fla1BP (do inglês *Fla1 Binding Protein*). Este trabalho demonstrou a interação entre Fla1 e Fla1BP, de forma que a Fla1 se localiza na membrana do corpo da célula, enquanto a Fla1BP se localiza na membrana do flagelo (Figura 5). Sun et al. (2013) também evidenciaram que a Fla1BP, assim como a Fla1, é expressa nas formas procíclicas, enquanto que Fla2 e Fla3 são expressas nas formas sanguíneas. Por fim, uma sequência hipotética similar a Fla1BP foi identificada em *T. brucei*, sendo sugerido que essa proteína seria expressa nas formas sanguíneas e teria um papel similar ao da Fla1BP (SUN et al., 2013). A proteína em questão foi descrita em

2013 por Woods e colaboradores. Infelizmente, a proteína foi também chamada de Fla3 (WOODS et al., 2013).

Figura 5 - Modelo de interação entre Fla1 e Fla1BP de *Trypanosoma brucei*. Ilustração do modelo proposto para a interação de Fla1 e Fla1BP em *Trypanosoma brucei*. FPC corresponde ao colar da bolsa flagelar.

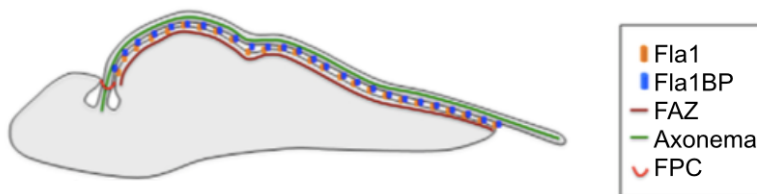


Ilustração adaptada de Sun et al (2013).

A Fla3 descrita por Woods et al. (2013) é uma proteína de membrana com aproximadamente 160 kDa e 818 aminoácidos expressa nas formas tripomastigotas sanguíneas do *T. brucei*. A proteína sofre diversas modificações pós-traducionalmente através de N-glicosilação e possui duas regiões hidrofóbicas. Fla3 é essencial para *T. brucei* e a sua deleção causa sérios defeitos no protozoário, como por exemplo, erros na divisão celular e na fixação do flagelo ao corpo celular (WOODS et al., 2013). Assim como as proteínas Fla1, Fla1BP, Fla2 e a primeira Fla3 descrita, a Fla3 descrita por Woods et al. (2013) está aderida na membrana celular e possui uma grande porção extracelular. A porção extracelular das cinco proteínas possui repetições de um domínio chamado de NHL, provavelmente envolvido na interação entre duas proteínas (SLACK; GARY, 1998; SUNTER; GULL, 2016).

Desde então, foram descritas em *T. brucei* 34 sequências gênicas que codificam para 30 proteínas diferentes, muitas das quais carecem de estudos funcionais e de caracterização molecular. É possível distinguir as proteínas descritas da FAZ de *T. brucei* em três domínios principais, de acordo com sua localização: domínio FAZ flagelar (FFD), domínio FAZ intracelular (FID) e domínio do filamento FAZ (FFID) (Figura 2). Entretanto, ainda são necessários estudos para entender como essas proteínas interagem para garantir a adesão do flagelo ao corpo do parasito (SUNTER; GULL, 2016).

Apesar do grande número de trabalhos recentes sobre a FAZ de *T. brucei*, a FAZ de *T. cruzi* e de *T. rangeli* continuam

pouco estudadas. Sunter et al. (2015) identificaram no genoma de *T. cruzi* 16 sequências ortólogas às proteínas que compõem a FAZ de *T. brucei* além da Gp72. Entretanto, não há estudos funcionais sobre essas proteínas de *T. cruzi*. Da mesma forma, a FAZ de *T. rangeli* permanece desconhecida, sendo raros os estudos sobre estas proteínas neste parasito. Para essa espécie, apenas a KMP11 foi descrita (DIEZ et al., 2005, 2008; STOCO et al., 2014; THOMAS et al., 2000).

Tendo em vista a importância da adesão flagelar para a divisão celular e motilidade de *T. brucei* e a carência de estudos sobre os elementos e processos de adesão flagelar de *T. cruzi* e *T. rangeli*, a identificação e caracterização de proteínas nas duas espécies é relevante para entender aspectos da biologia destes parasitos. Ademais, considerando a importância dessas proteínas na viabilidade de *T. brucei*, a caracterização das proteínas da FAZ em *T. cruzi* pode ser importante para a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos contra a Doença de Chagas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas da FAZ de *Trypanosoma cruzi* e de *Trypanosoma rangeli* e estudar a Fla3 em ambas as espécies.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar em *T. rangeli* e *T. cruzi* possíveis proteínas ortólogas às proteínas da FAZ de *T. brucei*;
- Comparar as sequências das proteínas da FAZ de *T. rangeli* e *T. cruzi* quanto à identidade e presença de domínios conservados em relação às proteínas descritas em *T. brucei*;
- Amplificar, clonar e obter a sequência completa dos genes codificantes para a proteína Fla3 de *T. rangeli* (cepas Choachí e SC58) e *T. cruzi* (cepa Y);
- Analisar comparativamente as sequências nucleotídicas e aminoácídicas de Fla3 quanto a diferenças intra- e inter-específicas;
- Expressar, de forma heteróloga em *Escherichia coli*, um fragmento da glicoproteína Fla3 de *T. rangeli* (TrFla3_Frag2), visando a produção de antissoro policlonal anti-Fla3;
- Analisar a expressão proteica de Fla3 nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANÁLISES *IN SILICO*

As sequências aminoacídicas das proteínas descritas na FAZ de *T. brucei* (Apêndice A) foram utilizadas para a busca de genes no genoma de *T. cruzi* (cepa CL Brener) e *T. rangeli* (cepa SC58), utilizando como ferramenta o programa BLASTp. A cepa CL Brener é uma cepa híbrida cujo genoma é composto de dois haplótipos denominados como *Esmeraldo-Like* (derivada de um ancestral TcII) e *Non-Esmeraldo-like* (derivada de um ancestral TcIII) (EL-SAYED et al., 2005). Devido à essa dualidade de haplótipos, as sequências encontradas foram diferenciadas de acordo com a sua origem - *Esmeraldo-like* (EL) e *Non-Esmeraldo-like* (NEL). Foram utilizadas as bases de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) e o banco de dados interno do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a escolha das sequências em *T. cruzi* e *T. rangeli*, foram utilizados como critérios de inclusão a presença de domínios conservados e a identidade com as proteínas de *T. brucei*. As sequências encontradas para cada proteína foram analisadas individualmente, aceitando-se as sequências com identidade superior a 30% (Apêndice A e B). Para alguns casos, valores de identidade inferiores a 30% foram aceitos. Além das sequências nucleotídicas, as sequências aminoacídicas preditas das duas espécies foram selecionadas.

Para a busca de domínios conservados, foi utilizado o programa RPS-BLAST (*Reverse Position-Specific BLAST*) a partir do banco CDD (*Conserved Domain Database*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Os principais domínios conservados descritos nas proteínas da FAZ de *T. brucei* foram utilizados como critério para a seleção das proteínas de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Na comparação quanto à identidade, as sequências aminoacídicas de cada proteína das três espécies estudadas foram alinhadas através do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O alinhamento foi então utilizado para a construção de uma matriz de similaridade no programa SIAS (do inglês *Sequence Identity And Similarity*) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), onde foram obtidos os valores de identidade e similaridade.

As sequências de *T. cruzi* e *T. rangeli* ortólogas à Fla3 de *T. brucei* tiveram suas sequências aminoacídicas preditas através do programa Translate do pacote Expasy (www.expasy.org). As sequências aminoacídicas preditas foram então utilizadas para a

análise das características físico-químicas das proteínas através do programa *ProtParam*, também do pacote Expasy. A predição de sítios de glicosilação foi realizada através do programa NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Por fim, também foi analisada a topologia proteica através do programa *Phobius prediction* (<http://phobius.sbc.su.se>).

2.2 CULTIVO DE PARASITOS

Neste estudo foram utilizadas as cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli*, as cepas Y e Colombiana de *T. cruzi* e a cepa PP75 de *Leishmania infantum* (NICOLLE, 1908). As formas epimastigotas das cepas SC58, Choachí, Y e Colombiana foram mantidas em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 27°C através de passagens semanais.

Para obter as formas tripomastigotas das cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli*, utilizou-se o protocolo descrito por Koerich et al. (2002) com algumas modificações. $1,2 \times 10^8$ formas epimastigotas foram cultivadas em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Himedia), pH 8,0, suplementado com 5% de SBF. Entre o 7º e o 8º dia foi realizado um esfregaço da cultura. A lâmina foi corada com Giemsa (Merck) e os parasitos foram observados em microscópio óptico, quando foi calculada a porcentagem de diferenciação observando-se a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo.

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas através do cultivo do parasito com as células L929. A cultura de células foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 5% de SBF a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera

umedecida através de passagens semanais ou quando atingissem a confluência celular. As monocamadas de células foram infectadas com formas tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* previamente congeladas e estocadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Após 72 h de infecção, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante das culturas, sendo centrifugadas por 10 min a $3.000 \times g$ e lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 antes do congelamento do precipitado a -20°C.

O cultivo das formas promastigotas de *L. infantum* foi realizado em meio *Schneider's Insect medium* (Sigma) suplementado com 10% de SBF, 5% de urina, 100 U/ml de

penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 27°C (HENDRICKS; WRIGHT, 1979).

2.3 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DA FLA3

2.3.1 Desenho de iniciadores para amplificação da *TcFla3* e *TrFla3* via PCR

As sequências ortólogas à Fla3 de *T. brucei* encontradas em *T. cruzi* (código de acesso TcCLB.503571.19 disponível no TriTrypDB), doravante denominada de *TcFla3*, e *T. rangeli* (código de acesso TcRangeli-21_42000_43850 disponível no banco de dados do Laboratório de Protozoologia) doravante denominada de *TrFla3*, foram utilizadas para o desenho dos iniciadores com o intuito de amplificar a ORF completa de cada gene, assim como dois fragmentos de cada gene (Quadro 2).

Para a escolha dos fragmentos a serem amplificados de cada gene, foram evitadas a presença de códons raros e regiões hidrofóbicas no intuito de facilitar a expressão heteróloga dos mesmos em *E. coli*. Os códons raros foram identificados utilizando o programa *Rare Codon Caltor* (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>) e a análise da hidrofobicidade foi realizada através da ferramenta *ProtScale* (<http://web.expasy.org/protscale/>), utilizando a escala descrita por Kyte e Doolittle (1982).

Após a escolha dos fragmentos, os iniciadores específicos para a amplificação das sequências alvo foram desenhados utilizando-se as ferramentas *Primer-BLAST* e o pacote *DNAStar*. Os iniciadores foram desenhados com a adição de sítios de restrição em suas porções 5' visando a sub-clonagem em vetores de expressão (Quadro 1). O par de iniciadores dirigidos à *TcFla3* de *T. cruzi* é o único que não possui adição de sítios de restrição pois foi desenhado apenas visando a clonagem no vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega).

Quadro 1 - Desenho de iniciadores visando a amplificação da Fla3 de *Trypanosoma cruzi* (*TcFla3*) e *Trypanosoma rangeli* (*TrFla3*). Os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados.

Espécie	Região amplificada	Iniciador	Sequência do iniciador (5' - 3')	Enzima de restrição	Temperatura de ligação (°C)
<i>T. cruzi</i>	<i>TcFla3</i>	<i>TcFla3_OR_F_F</i>	TGGCCATTGAAA ATGTCTCG	-	56
		<i>TcFla3_OR_F_R</i>	ACTTCTCTTTTT CGCTTCTAC	-	
	<i>TcFla3_Frag1</i>	<i>TcFla3_Frag1_F</i>	CATATGATTTCT GGAATCACGGG CTC	<i>XhoI</i>	58
		<i>TcFla3_Frag1_R</i>	CTCGAGTAATCG CATTTAAAGCCA GTC	<i>NdeI</i>	
	<i>TcFla3_Frag2</i>	<i>TcFla3_Frag2_F</i>	CATATGAAGTTG GTTACTGTTGTG CGAG	<i>XhoI</i>	58
		<i>TcFla3_Frag2_R</i>	CTCGAGATGCAG ATTTATGGCGAG GC	<i>NdeI</i>	
<i>T. rangeli</i>	<i>TrFla3</i>	<i>TrFla3_OR_F_F</i>	GAATTCA ATGCGTATCTCG CTCCTTCAG	<i>EcoRI</i>	62
		<i>TrFla3_OR_F_R</i>	AAGCTT GGAGGGCAGGT TTAGTATCG	<i>HindIII</i>	
	<i>TrFla3_Frag1</i>	<i>TrFla3_Frag1_F</i>	CATATGACGCAG ATGACAGGCAC AC	<i>XhoI</i>	58
		<i>TrFla3_Frag1_R</i>	CTCGAGAGCAG ATACCCGTTTGA GATG	<i>NdeI</i>	
	<i>TrFla3_Frag2</i>	<i>TrFla3_Frag2_F</i>	CATATGAACGGC GTCGCAAACATC AC	<i>XhoI</i>	58

Espécie	Região amplificada	Iniciador	Sequência do iniciador (5'- 3')	Enzima de restrição	Temperatura de ligação (°C)
	Frag2	TrFla3_Frag2_R	CTCGAGAAATGC AGCCGCGGTTAC AC	<i>NdeI</i>	

2.3.2 Extração do DNA genômico

As culturas de formas epimastigotas das cepas Choachí e SC58 (*T. rangeli*), Colombiana e Y (*T. cruzi*) (item 2.2) foram utilizadas para a extração de DNA genômico. As culturas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 720 x g por 10 min e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 a temperatura ambiente. Os parasitos foram então eluídos em cerca de quatro vezes o seu volume de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS), sendo adicionado Proteinase K (100 µg/ml). As amostras foram mantidas a 42°C por 12 h, seguindo-se o protocolo padrão de extração pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Realizada a extração, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e o resultado foi registrado digitalmente. Além disso, as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à sua pureza através de espectrofotometria, observando-se a absorbância em 260 nm e as relações 260/280 nm e 260/230 nm utilizando-se um equipamento BioPhotometer (Eppendorf).

2.3.3 Amplificação via PCR e clonagem da Fla3

O DNA genômico extraído das cepas de *T. cruzi* e de *T. rangeli* (item 2.3.2) foi utilizado para a amplificação da ORF completa ou dos fragmentos selecionados da Fla3. Para isto, foram utilizados os iniciadores específicos desenhados no item 2.3.1, além da enzima *Taq* DNA polimerase em tampão próprio. Foram utilizadas diferentes marcas de *Taq* DNA polimerase neste trabalho, sendo elas Applied Biosystems, Fermentas e Promega. Para a padronização da reação de amplificação, foram realizadas reações com 10, 30 e 50 ng de DNA genômico. Além disso, foram utilizadas diferentes temperaturas de ligação dos iniciadores (Quadro 2). Para a amplificação da ORF completa de *T. cruzi* também foram testadas as temperaturas de ligação de 52, 54, 56, 58, 60 e 62°C, bem como uma reação constituída de cinco

ciclos com temperatura de ligação de 45°C e 30 ciclos com temperatura de ligação de 56°C.

Para a verificação dos produtos de PCR, 2 µl de cada amostra, assim como um padrão de peso molecular (PPM) conhecido, foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose 1%. Este gel foi corado com brometo de etídio e o tamanho das bandas resultantes da amplificação foi estimado através de comparação com o PPM.

Após verificação através de eletroforese, os produtos de amplificação dos fragmentos e das ORF completas foram

clonados no vetor pGEM-T easy (Promega) seguindo-se recomendações do fabricante. Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α cálcio-competentes, seguindo-se o protocolo padrão do laboratório para transformação bacteriana por choque-térmico. Após a transformação, as bactérias foram adicionadas de meio SOC (2 g/l Triptona, 0,5 g/l Extrato de Levedura, 1 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 2 mM Mg²⁺, 2 mM Glicose) e mantidas a 37°C, sob agitação, por 1 h. Após a incubação, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB (10 g/l Triptona, 5 g/l Extrato de Levedura, 0,17 mM NaCl) contendo X-gal (20 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) e mantida por 12 h a 37°C. Após o crescimento, a ligação do inserto no vetor foi verificada através da coloração branca das colônias e confirmada através de PCR diretamente das colônias, utilizando-se iniciadores dirigidos ao vetor, seguindo-se de observação dos fragmentos amplificados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As colônias positivas contendo os insertos desejados foram repicadas e crescidas a 37°C em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) por 16 h sob agitação. Após o crescimento, os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram extraídos por lise alcalina (Mini-prep) conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). A extração dos plasmídeos foi confirmada através de visualização em gel de agarose 1% e os plasmídeos extraídos foram armazenados a -20°C.

Uma vez que este trabalho incluiu a geração e a manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), é importante salientar que o Laboratório de Protozoologia da UFSC está inserido no Certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (Número 101/99) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), estando autorizado a realizar experimentos em regime de contenção. O

presente projeto foi previamente protocolado junto à CIBio/UFSC.

2.3.4 Sequenciamento dos insertos clonados

A identidade da *TcFla3* no vetor de clonagem pGEM-T easy foi confirmada através de sequenciamento de DNA utilizando-se o equipamento *Applied Biosystems 3500* do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC, utilizando-se o *kit BigDye Terminator 3.1* seguindo as especificações do fabricante. Foram realizados múltiplos sequenciamentos utilizando iniciadores variados dirigidos ao inserto ou à sequência do vetor. As sequências obtidas foram agrupadas e avaliadas quanto a sua qualidade utilizando-se o pacote Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org>), sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do programa BLASTn do TriTrypDB. A sequência também foi traduzida através do programa *Translate* e analisada quanto a parâmetros físico-químicos e topologia conforme descrito no item 2.1

2.3.5 Subclonagem em vetor de expressão

Inicialmente, os plasmídeos de clonagem contendo as ORF e os fragmentos da *Fla3* das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* e fragmentos os da cepa Y de *T. cruzi* foram digeridos com as enzimas de restrição inseridas nos iniciadores (Quadro 2). Os vetores de expressão pET47b e pET14b (Novagen) foram digeridos com as enzimas *EcoRI* / *HindIII* e *XhoI* / *NdeI*, respectivamente. As reações de digestão ocorreram por 12 h a 37°C, segundo as instruções do fabricante.

Os produtos das digestões foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corados pelo brometo de etídio e as bandas de interesse foram excisadas dos géis e

TM

purificadas utilizando-se o kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Após confirmação da pureza dos produtos excisados através de nova eletroforese em gel de agarose a 1%, os insertos foram ligados nos vetores de expressão. Cada reação de ligação conteve 6 µl do inserto, 2 µl do vetor, 1 µl de T4 ligase (Promega) e 1 µl de tampão próprio da enzima, sendo mantida a 16 °C por 15 h.

As ORF das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* foram ligadas no vetor pET47b, enquanto que a ORF da cepa Y de *T. cruzi* e os fragmentos das cepas Choachí, SC58 (*T. rangeli*), Y e

Colombiana (*T. cruzi*) foram ligados no vetor pET14b. Os produtos de ligação foram utilizados para a transformação por choque-térmico de *E. coli* DH5a cálcio-competentes, assim como o descrito no item 2.3.3. Após o crescimento por 1 h em meio SOC, a suspensão celular de cada transformação foi aplicada em placas contendo meio LB e o antibiótico específico para cada vetor: kanamicina (15 µg/ml) para pET47b e ampicilina (100 µg/ml) para pET14b.

2.3.6 Verificação da clonagem em vetores de expressão

A ligação dos insertos nos vetores de expressão foi verificada através de PCR de cada colônia obtida utilizando-se iniciadores específicos para cada plasmídeo (pET14b ou pET47b). As colônias positivas foram então crescidas a 37°C por 16 h sob agitação em meio LB líquido contendo os antibióticos específicos para cada vetor. Os plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina conforme descrito no item 2.3.3. O sequenciamento e confirmação da identidade dos insertos e da sua inserção na correta fase de leitura dos plasmídeos foi verificada conforme o item 2.3.4. As sequências aminoacídicas, obtidas através do programa *Translate*, foram analisadas quanto à presença de cauda de histidina e a existência de códons de parada.

2.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA *Tr*Fla3 E *Tr*Fla3_Frag2

2.4.1 Transformação das bactérias competentes

Após a confirmação da clonagem nos vetores de expressão, os plasmídeos pET47b contendo as ORF da Fla3 das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* (*Tr*_Fla3) foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta utilizando-se choque térmico. O plasmídeo pET14b contendo o Fragmento 2 do gene *Tr*_Fla3 da cepa SC58 de *T. rangeli* (*Tr*Fla3_Frag2) foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. As transformações foram realizadas conforme descrito no item 2.3.3 e a suspensão celular foi aplicada em diferentes combinações de antibiótico (Quadro 2).

Quadro 2 - Antibióticos utilizados para seleção de bactérias transformadas em função de cada linhagem utilizada.

Plasmídeo	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	Antibiótico	Concentração do antibiótico (µg/ml)
pET47b	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Kanamicina	15
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus	Kanamicina	15
		Clorofenicol	34
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Kanamicina	15
		Clorofenicol	34
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	Kanamicina	15
		Clorofenicol	34
pET14b	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus	Ampicilina	100
		Clorofenicol	34

2.4.2 Expressão heteróloga de proteínas e fragmentos proteicos recombinantes

A fim de determinar as melhores condições para a expressão heteróloga das proteínas recombinantes *Tr_Fla3* das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* e do fragmento proteico recombinante *TrFla3_Frag2*, pré-inóculos em meio LB líquido contendo os antibióticos específicos (Quadro 2) foram preparados utilizando para cada clone, sendo as culturas crescidas por 16 h a 37°C sob agitação. Os pré-inóculos foram utilizados para inocular uma nova cultura em meio LB suplementado com os antibióticos requeridos para cada construção utilizando-se uma diluição de 1:10, sendo as culturas crescidas a 37°C a 130 rpm até atingir uma densidade óptica (D.O.) entre 0,5-0,6 a 600 nm. Após atingida a D.O. de interesse, 1 ml de cada cultura foi separado para servir como controle de cultura não induzida. Ao restante foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final

de 1 mM. A expressão heteróloga de cada colônia foi testada em três temperaturas (15, 27 e 37°C) e três diferentes tempos (3, 6 e 12 h). Após cada tempo de indução, as culturas foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min, sendo as células suspensas em PBS, adicionadas de tampão de amostra para SDS-PAGE (20% glicerol; 0,5% azul de bromofenol; 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4,4% SDS e 2% mercaptoetanol) e fervidas por 5 min. Os extratos proteicos obtidos foram então resolvidos em géis de poliacrilamida SDS-PAGE nas concentrações de 10% (para a visualização da *Tr_Fla3r*) e 12% (para a visualização da *TrFla3_Frag2*). Para observação das proteínas, os géis foram corados com Coomassie Blue (0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R250 em 90 ml de metanol:água (1:1 v/v) e 10 ml de ácido acético glacial) por 12 h, sob agitação, em temperatura ambiente.

A detecção dos produtos de expressão heteróloga foi realizada através da técnica de *Western Blot*, utilizando um anticorpo anti cauda de histidina (Anti-HisTag) direcionado à cauda de seis histidinas adicionada nos produtos de expressão. Para tanto, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) ou PVDF conforme o descrito por Towbin e colaboradores (1979). A transferência para a membrana foi confirmada através da coloração da membrana com Ponceau S 1% em ácido acético 10% por cinco min ou através da coloração do gel após a transferência com Coomassie Blue.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada sob agitação por 1 h com a solução de bloqueio (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% Tween 20; 5% leite desnatado) a temperatura ambiente. O excesso da solução de bloqueio foi retirado através de lavagens com *Blotting Buffer* (50 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% Tween 20). Em seguida, a

membrana foi mantida por 90 min com o anticorpo anti-HisTag (Sigma) na diluição de 1:5.000 em solução de bloqueio a 2%. A membrana foi então novamente lavada e mantida por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000. Após nova lavagem, o reagente ECL (GE Healthcare) foi adicionado a membrana e esta foi exposta por 2 min em filme radiográfico, o qual foi revelado no equipamento SRX101A (Konica-Minolta), conforme especificações do fabricante. O tamanho das proteínas recombinantes foi estimado a partir da comparação com um padrão de peso molecular conhecido, sendo este relacionado ao esperado teórico obtido no item 2.1.

2.4.3 Teste de solubilidade dos fragmentos proteicos recombinantes

Para verificar a solubilidade dos fragmentos proteicos recombinantes, somente foram utilizados as condições de expressão com melhores resultados na etapa anterior. As batérias foram lavada em PBS (pH 7,2), a 4°C, por 10 min a 5.000 x g e submetidas à lise por ultra-som em banho de gelo em aparato Ultrasonic dismembrator (Fisher) por 10 vezes de 30 segundos cada na potência 12 com 30 segundos de intervalo entre pulsos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 min a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel) foi adicionado solução de SDS 10%. As amostras das duas frações foram adicionadas de tampão de amostra para SDS-PAGE e resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Além dessas amostras, foi resolvida em gel uma proteína recombinante Arginina quinase gentilmente cedida pela MSc Carime Lessa Mansur Pontes para ser utilizada como controle positivo devido à presença da cauda de histidina. As amostras presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a ensaio de *Western Blot* conforme o descrito no item 2.4.2.

2.4.4 Purificação da proteína recombinante

A fim de purificar o fragmento proteico recombinante, o melhor tempo (3 h) e temperatura (37°C) para a indução da expressão de *TrFla3_Frag2* foi escolhido, conforme o definido no item 2.4.3. O clone *TrFla3_Frag2* foi crescido em 30 ml de meio LB contendo ampicilina e clorofenicol a 37°C por 16 h. Desses, 25 ml foram adicionados de 225 ml de meio LB contendo antibióticos e crescidos conforme o descrito no item 2.4.2. Após atingir a D.O. entre 0,5 e 0,6, a expressão do fragmento proteico recombinante foi induzida por 3 h a 37°C com 1 mM de IPTG, sendo a cultura centrifugada a 2.000 x g por 15 min e as bactérias lisadas pela adição do tampão B pH 8 (8M de ureia, 100 mM de NaH₂PO₄, 100 mM de Tris HCl pH 8,0) por 1 h a 60°C. O lisado foi tratado com RNase (10 µg/ml) a temperatura ambiente por cinco minutos, distribuído em microtubos cônicos de 2 ml e centrifugados a 12.000 x g por 30 min a 4°C. Parte do sobrenadante foi reservado para análise por gel SDS-PAGE 12%. O restante do lisado foi adicionado à uma coluna contendo resina Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com o tampão B, e mantido incubando por 1 h a 4°C sob agitação. Após 1 h, a mistura de lisado e resina foi passada por uma coluna de

purificação por gravidade e o lavado (*Flow Through*) foi reservado. Após lavagem da resina por cinco vezes com tampão de lavagem pH 6,3 (8M de ureia, 100 mM de NaH₂PO₄, 100 mM de Tris HCl pH 8,0), a proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição pH 4,5 (8M de ureia, 100 mM de NaH₂PO₄, 100 mM de Tris HCl pH 8) por sete vezes. A cada vez, o tampão de eluição interagiu com a resina por três minutos, para em seguida passar pela coluna através da ação da gravidade. A cada etapa, alíquotas das lavagens e das eluições foram guardadas.

Após a purificação, as eluições foram dialisadas por 12 h em tampão de diálise 1 pH 8,5 (0,5 mM de EDTA, 500 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8,5, 20% de glicerol) e, posteriormente, 12 h com tampão de diálise 2 pH 8,5 (0,5 mM de EDTA, 500 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8,5, 40% de glicerol). Após a diálise, as alíquotas contendo o sobrenadante, o *Flow Through*, as cinco lavagens e as cinco eluições foram adicionadas de tampão de amostra para SDS-PAGE e resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE conforme o descrito no item 2.4.2. As amostras das eluições também foram quantificadas através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.5 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL ANTI-*TrFla3_Frag2*

2.5.1 Animais e aspectos éticos

Para a obtenção do soro policlonal anti-*TrFla3_Frag2*, foram utilizadas quatro fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c com idade aproximada de 45 dias. Os animais foram fornecidos e mantidos no Biotério Setorial MIP/UFSC em mini-isoladores contendo serragem, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos envolvendo o uso de animais de experimentação foram realizados seguindo os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, os mesmos aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: PP00822).

2.5.2 Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro

Foram realizadas cinco imunizações por via subcutânea com intervalo de 10 dias utilizando 50 µg do fragmento proteico recombinante purificado (item 2.4.4) em cada imunização. Na primeira imunização, os fragmentos proteicos foram emulsificados em adjuvante completo de Freund (v/v) (Sigma-Aldrich) e nas demais, a emulsificação foi realizada em Alu-Gel S (Hidróxido de alumínio 1,3%) (Serva). Após a terceira imunização foi iniciada a pesquisa da geração de anticorpos anti-

TrFla3_Frag2 através da técnica de *Western Blot* (item 2.4.2), utilizando-se uma diluição do soro de 1:250. Dez dias após a última imunização, o sangue foi retirado através de punção cardíaca para a separação do antissoro policlonal, sendo os animais sacrificados por anestesia profunda.

2.6 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO ANTI-*TrFla3_Frag2* ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE TRIPANOSOMATÍDEOS

O reconhecimento da Fla3 pelo antissoro anti-*TrFla3_Frag2* foi verificada em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* (cepas Choachi e SC58), *T. cruzi* (cepa Y) e promastigotas de *L. infantum* (cepa PP75). As culturas foram centrifugadas a 1620 x g por 10min a temperatura ambiente, sendo as massas celulares lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2). Em seguida, os parasitos foram adicionados de tampão de lise (500 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH 8, 1% Triton X-100), agitados vigorosamente e armazenados em gelo. O extrato proteico dos parasitos foi dosado pelo método de Bradford (1976) e 50 µg de cada amostra, assim como 0,5 µg *TrFla3_Frag2* recombinante, foram resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. As proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de PVDF visando a detecção da Fla3 por *Western blot* utilizando o antissoro anti-*TrFla3_Frag2* numa diluição de 1:100 e expondo a membrana ao filme radiográfico por 1 h.

3. RESULTADOS

3.1 PROTEÍNAS CONSTITUINTES DA FAZ DE *T. cruzi* E DE *T. rangeli*

Dentre as 30 proteínas descritas como constituintes da FAZ de *T. brucei* (Apêndice A), foram identificadas sequências ortólogas a 25 proteínas em *T. cruzi* (cepa CL Brener) e 25 em *T. rangeli* (cepa SC58) (Quadro 3, Apêndice B e C). Estas proteínas correspondem a 26 sequências em EL, 24 em NEL e a 29 em *T. rangeli*. Alguns dos domínios descritos para as proteínas da FAZ de *T. brucei* não foram identificados através de RPS-BLAST nas sequências aminoácidas desta espécie. Além disso, algumas sequências de *T. rangeli* não foram encontradas nos bancos de dados públicos sendo somente encontradas no banco de dados do Laboratório de Protozoologia, uma vez que este banco de dados possui a montagem mais recente do genoma do *T. rangeli* aliando-se grande quantidade de dados gerados na plataforma Illumina aos dados do genoma publicado em 2014 (STOCO et al., 2014).

Quadro 3 - Proteínas da FAZ em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Número de sequências de *T. cruzi* e *T. rangeli* ortólogas às proteínas da FAZ de *T. brucei* e presença de domínios conservados. FID = domínio FAZ intracelular, FFD = domínio do filamento FAZ, FFD = domínio FAZ flagelar, EL = Cepa CL-Brener de *T. cruzi*, haplótipo Esmeraldo-Like. NEL = Cepa CL-Brener de *T. cruzi*, haplótipo Non-Esmeraldo-Like. As cores correspondem à presença do domínio conservado. Verde = Presença do domínio conservado. Vermelho = Ausência do domínio conservado na espécie ou haplótipo em questão. Preto = ausência de sequência ortóloga na espécie ou haplótipo em questão.

Locali- zação	<i>T. brucei</i>			Número de Sequências encontradas		
				<i>T. cruzi</i>		<i>T. rangeli</i>
	Proteí- na	Domínios Conser- vados	Código de Acesso do Domínio	EL	NEL	
FID	FLA1	NHL	cl18310			

Locali- zação	<i>T. brucei</i>			Número de Sequências encontradas		
				<i>T. cruzi</i>		<i>T. rangeli</i>
	Proteína	Domínios Conservados	Código de Acesso do Domínio	EL	NEL	
FID	FLA2	NHL	cl18310	1	1	1
	FLA3	NHL	cl18310			
	FLA1 BP	-	-			
	FLA3	NHL	cl18310	1	1	1
	Canal ²⁺ Ca	Transportador de Ion	pfam00520		1	1
	FAZ5	Chaperona J	cl28246	1	1	1
FFID	FAZ9	Repetições ARM	cl25709	1	1	1
	FAZ2	-	-	1	1	1
	FAZ3	-	-	1	1	1
	FAZ12	-	-	1		1
	FAZ13	-	-			1
	FAZ14	-	-	1 ¹	1 ¹	1 ¹
	FAZ8	-	-	1		1

Locali- zação	<i>T. brucei</i>			Número de Sequências encontradas		
				<i>T. cruzi</i>		<i>T. rangeli</i>
	Proteína	Domínios Conservados	Código de Acesso do Domínio	EL	NEL	
FFID	FAZ1	-	-	1		1
	CC2D	C2	smart00239		1	1
	FAZ4	-	-	1	1	1
	FAZ6	WD	cl25539	1	1	1
	FAZ7	Kinesina	cl22853	1	1	1
	TbVAP	MSP	cl25657	1	1	1
	TbSAS ₄	Tcp10	cl06299	1	1	1
	TOEF AZ1	-	-	1	1	1
FFD	ClpG M6	Calpain	cl00051	3	1	1
	FLAM ₃	Clu	cl16180	2	2	1
Corpo celular e flagelo	KMP1 ₁	KMP11	pfam03037	2	3	4
Desconhecido	FAZ10	-	-	1	1	
	FAZ11	-	-	1 ¹	1 ¹	1 ¹

Localização	<i>T. brucei</i>			Número de Sequências encontradas		
				<i>T. cruzi</i>		<i>T. rangeli</i>
	Proteína	Domínios Conservados	Código de Acesso do Domínio	EL	NEL	
Desconhecido	FAZ15	-	-		1	1
	FAZ16	LysM	-	1 ²	1 ²	1 ²
	FAZ17	-	-	1		2

¹ FAZ14 e FAZ11 correspondem a mesma sequência em *T. cruzi* e *T. rangeli*. ² Domínio LysM não encontrado em *T. brucei*, mas sim em *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Em contraste com as sete proteínas de *T. brucei* do domínio FID, *T. cruzi* e *T. rangeli* revelaram uma redução no número dessas, ambos apresentando apenas sequências ortólogas a quatro proteínas. Ambas as espécies possuem uma única proteína que equivale a *TbFla1*, *TbFla2* e *TbFla3* (a primeira *TbFla3* descrita) e uma outra proteína que corresponde às sequências de *TbFla1BP* e *TbFla3*. Em *T. brucei*, *TbFla1*, *TbFla2* e *TbFla3* possuem o domínio NHL, o qual foi encontrado nas sequências ortólogas de *T. cruzi* e de *T. rangeli*. O mesmo foi observado para a *Faz5*, que manteve o domínio chaperona conservado em *T. cruzi* e *T. rangeli*, e para o Canal Ca^{2+} , proteína cujo o domínio transportador de íon esteve preservado nas sequências encontradas. Para *T. cruzi*, a sequência ortóloga a essa proteína foi encontrada apenas no haplótipo NEL. A presença de genes exclusivos de um dos haplótipos de *T. cruzi* não foi um fato isolado e isso será destacado no decorrer deste trabalho. O domínio NHL foi descrito também para *TbFla1BP* e para a *TbFla3* (WOODS et al., 2013). Entretanto, o domínio não foi encontrado na *TbFla1BP* em nossas análises e nem nas sequências ortólogas em *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Dentre as proteínas FFID, *T. rangeli* apresentou sequências ortólogas a todas as 15 proteínas de *T. brucei*, apesar de que a sequência encontrada para a *TbFaz14* seja a mesma encontrada para *TbFaz11*, uma proteína com localização desconhecida. Apesar da literatura descrever o domínio

PFAMB506 para as proteínas *TbFaz8*, *TbFaz1* e *TbFaz4*, este domínio não foi encontrado nas sequências de *T. brucei*, *T. cruzi* e *T. rangeli*. As demais proteínas (*TbFaz9*, *TbCC2D*, *TbFaz6*, *TbFaz7*, *TbVAP* e *TbSAS4*) tiveram seus domínios preservados nas sequências encontradas para *T. rangeli*.

Para *T. cruzi*, as proteínas FFID estão presentes de forma bastante heterogênea em EL e NEL. Isto é, *TbFaz12*, *TbFaz8* e *TbFaz1* só foram encontradas em EL, enquanto que *TbCC2D* foi identificada apenas em NEL. Também houve diferença entre as sequências de EL e NEL correspondentes à *TbFaz9* quanto ao tamanho e presença do domínio Repetições ARM: a sequência identificada em EL não possui o domínio conservado e é menor que a de NEL (609 resíduos de aminoácidos a menos) e a de *T. brucei*. Apesar de menor, possui 97,27% e 53,45% de identidade em relação à sequência de NEL e *T. brucei*, respectivamente. Ademais, não foi encontrado nenhum ortólogo à *TbFaz13* em *T. cruzi*.

Quanto às proteínas FFD, houve diferença entre o encontrado para *T. cruzi* e *T. rangeli*. Para *T. cruzi*, foram identificadas três sequências ortólogas à *TbClpGM6* em EL e uma em NEL. Apesar das quatro sequências em *T. cruzi* apresentarem o domínio Calpain conservado, uma das sequências de EL corresponde a um fragmento e outra é um pseudogene. Em *T. cruzi* também foi identificado um maior número de sequências ortólogas à *TbFlaM3*: duas sequências de EL e duas de NEL. Apesar de duas das quatro sequências serem menores que a *TbFlaM3* e não serem sintênicas, as quatro possuem o domínio Clu conservado. Para *T. rangeli* foi identificada uma sequência correspondente para a *TbClpGM6* (545 resíduos de aminoácidos) e outra para *TbFlaM3* (1647 resíduos de aminoácidos), mas em *T. brucei* as duas sequências são maiores, com 5837 e 4151 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

Enquanto que *T. brucei* possui três sequências de KMP11, foram identificadas duas sequências em EL, três de NEL e quatro de *T. rangeli*. Tanto as sequências de *T. cruzi* quanto as de *T. rangeli* apresentaram o domínio KMP11 conservado e tiveram acima de 90% de identidade em relação à *TbKMP11*. Essas foram as sequências aminoacídicas com maior identidade em relação as proteínas da FAZ de *T. brucei*.

Entre as sequências de proteínas da FAZ com localização desconhecida, também foram identificadas diferenças entre os haplótipos EL e NEL de *T. cruzi*: a ortóloga de *TbFAZ15* foi identificada apenas em NEL, enquanto que a ortóloga de *TbFAZ17* foi identificada apenas em EL. Para *T. rangeli* foram

identificadas duas sequências correspondentes à *TbFAZ17* e uma sequência correspondente à *TbFAZ15*. Apesar de descrito para a *TbFAZ10*, o domínio PFAMB506 não foi encontrado na sequência, nem nas sequências correspondentes em EL e NEL. Em *T. rangeli* não identificou-se ortólogos da *TbFAZ10*. Por fim, foram identificados duas sequências correspondentes à *TbFAZ16* em *T. cruzi* (uma em EL e outra em NEL) e uma sequência correspondente em *T. rangeli*. Na literatura está descrito um domínio LysM na *TbFAZ16*. Entretanto, o domínio não foi encontrado na sequência de *T. brucei*, mas sim nas sequências correspondentes em *T. cruzi* e *T. rangeli*.

3.2 FLA3 DE *T. cruzi* E *T. rangeli*

Apesar de que as sequências encontradas como ortólogas em *T. cruzi* e *T. rangeli* da *TbFla3* descrita por Woods et al. (2013) terem sido as mesmas encontradas como ortólogas da *TbFla1BP*, optou-se pelo uso do termo Fla3 em *T. cruzi* e *T. rangeli*, uma vez que não há diferença significativa em níveis de identidade e não foram realizados estudos de interação com as proteínas ortólogas à *TbFla1* para poder afirmar a interação entre Fla1 e Fla1BP em *T. cruzi* e *T. rangeli*. Portanto, neste trabalho as sequências com número de acesso TcCLB.503571.19, TcCLB.509561.9 e TcRangeli-21_41583_43793 serão denominadas de Fla3.

3.2.1 Amplificação, clonagem e análise da sequência Fla3 de *T. rangeli*

A sequência nucleotídica da Fla3 de *T. rangeli* (cepa SC58) possui um tamanho de 2.214 pb. Para a padronização da amplificação da *TrFla3*, o DNA genômico extraído da cepa Choachí foi diluído nas concentrações de 10, 30 e 50 ng/μl, a fim de verificar-se a melhor concentração de DNA para a amplificação do gene Fla3. Nas três concentrações de DNA genômico testadas ocorreu a amplificação de uma banda predominante e uma banda inespecífica de tamanho menor (Figura 6). A banda predominante tem aproximadamente 2.238 pb, o que corresponde ao tamanho da *TrFla3* somado dos iniciadores. Como as bandas correspondentes a 30 e 50 ng/μl tiveram uma banda com intensidade similar, foi escolhida a concentração de 30 ng/μl para as demais amplificações.

Após a determinação da concentração ideal de DNA genômico a ser utilizada na amplificação, o DNA das cepas Choachí e SC58 foi utilizado para a amplificação da Fla3 (Figura 7). A banda de interesse de 2.238 pb foi purificada e ligada no

vetor pGEM-T easy. As colônias de cor branca obtidas foram selecionadas para confirmar a ligação do gene da Fla3 no plasmídeo através de PCR diretamente das colônias.

Figura 6 - Amplificação via PCR da *TrFla3* a partir de DNA genômico da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação do gene Fla3 da cepa Choachí de *T. rangeli* com 10 ng/μl (1), 30 ng/μl (2) e 50 ng/μl (3) de DNA genômico. PPM - padrão de peso molecular em pb (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). CN - controle negativo da reação (sem adição de DNA). A seta indica o tamanho esperado para a amplificação (2.238 pb).

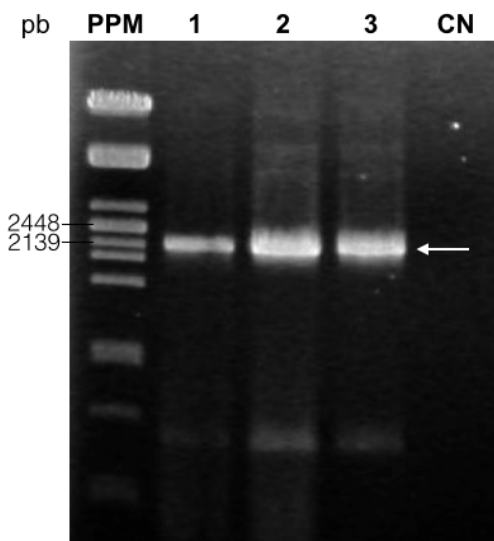
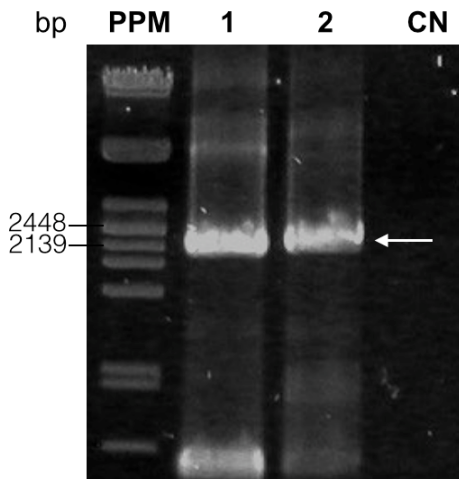


Figura 7 - Amplificação via PCR de *TrFla3* a partir de DNA genômico das cepas Choachí e SC58 de *Trypanosoma rangeli*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação do gene Fla3 de *T. rangeli* das cepas Choachí (1) e SC58 (2). PPM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). CN - controle negativo da reação (sem adição de DNA). A seta indica o tamanho esperado para a amplificação (2.238 pb).



Duas colônias foram selecionadas para cada cepa e submetidas a extração plasmidial. Após digestão com as enzimas de restrição o produto de ligação nos vetores de expressão foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α . As colônias resultantes foram testadas quanto à presença do inserto Fla3 através de PCR de colônia, utilizando-se os iniciadores específicos para a *Tr*Fla3. Para confirmar a identidade da *Tr*Fla3, bem como confirmar a correta inserção do inserto no vetor de expressão, os plasmídeos contendo os insertos das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* foram sequenciados. As sequências nucleotídicas obtidas foram de alta qualidade *Phred* superior a 20 (99% de precisão) e confirmaram a identidade do fragmento clonado.

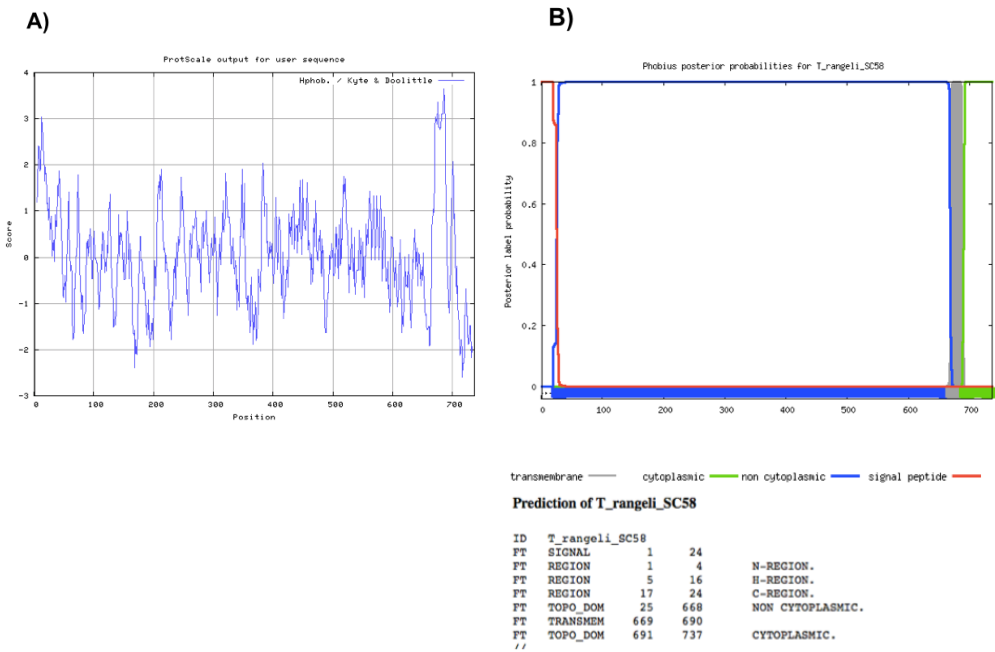
A sequência aminoacídica predita da Fla3 da cepa SC58 possui 99,72% de identidade com a sequência do banco de dados genômico desta cepa (TcRangeli-21_41583_43793) e 36,09% de identidade com a *Tb*Fla3. A sequência codifica para uma proteína com cerca de 737 resíduos de aminoácidos e massa molecular teórica de aproximadamente 80,5 kDa. Por outro lado, a Fla3 da cepa Choachí codifica para uma proteína com 730 aminoácidos de aproximadamente 80,05 kDa, 95,47% idêntica à Fla3 de SC58. Quando alinhadas com a *Tb*Fla3 (Figura 8), é possível observar que apesar de em *T. rangeli* estar ausente uma parte da sequência, existem aminoácidos conservados ao longo de toda sequência, principalmente na região C-terminal.

Figura 8 - Alinhamento da *TrFla3* das cepas Choachí e SC58 de *Trypanosoma rangeli* com a sequência aminoacídica da Fla3 de *Trypanosoma brucei*. Vermelho - regiões ausentes em *Trypanosoma rangeli*. Verde - região correspondente ao domínio NHL. * - resíduo de aminoácido conservado. : - resíduo de aminoácido com propriedades altamente conservadas. . - resíduo de aminoácido com propriedades fracamente conservadas.

<i>T. brucei</i>	MCFI FGVMENSLAKRIMSLRKLFPQLLLIMIGIAFVAVECIGAPVKLPRRVDITVAGQFGV	60
<i>T. rangeli</i> SC58	-----MRISLLQALL-----IVTSVLIAATLEMAAAMPLRYMVETVSGVSGV	42
<i>T. rangeli</i> Choachí	-----MRISLLQALL-----IVTSVLIAATLEMAAAMPLRYMVETVSGVSGV	42
	* : * * * * : : : * . : * : * * : * * * * *	
<i>T. brucei</i>	EGETNGYPNTRLTTEPYALCRGRTNDEILVGSSNSFNYSRKTKETGYLRYNVGDSV--	118
<i>T. rangeli</i> SC58	IGAVDGRGKSLLTRPLALCQGRNEDEILIGMEGFFRTYSRSTQMTGLLNGTAAADVDG	102
<i>T. rangeli</i> Choachí	IGAVDGRGKSLLTRPLALCQGRNEDEILIGMEGFFRTYSRSTQMTGLLNGTATDVG	102
	* . * * . . : * * * * * : * : * * * * * : * * * *	
<i>T. brucei</i>	ISGSSTINKPRSCVRGSENNHTIIFYDDQDKIRYIVGDDVSSFVPTSGSLNAVHVEG	178
<i>T. rangeli</i> SC58	LWANARVDKPGACVSTLRNNMMFVYFVESQNLRLYITNHSILS IQLEKGASFTDVALYGD	162
<i>T. rangeli</i> Choachí	LWANARVDKPGACVSTLRNNMMFVYFVESQNLRLYITNHSILS IQLEKGASFTDVALYGD	162
	. . . : * * * * * * : * : * * * * . . . : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	TLTYVDQNNKSVWKCGLGAGKFPQSCEEKFTSVTLDAKPEGIAVTSKGFIVTARDSSNR	238
<i>T. rangeli</i> SC58	RLYMTENQKNDVNSCEIGMDGTPTHCAEENDFKCE-YTKYNGIAVNLGVFVVGSSQT-	220
<i>T. rangeli</i> Choachí	RLYMTENQKNDVNSCEIGMDGTPTHCAEENDFKCE-YTKYNGIAVNLGVFVVGSSQT-	220
	* * : * * : * . * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	CALLWLDMSGGNRKNVSGGFVDVFTSGESGLVYAATEKELYTVTATDLSLVSFAGKNT	298
<i>T. rangeli</i> SC58	C-ICHFD-SRDTNISHLPGGYSDVFSVPSGVLAMSQQQLYHLHVAGSSMTVDLFAGNRS	278
<i>T. rangeli</i> Choachí	C-VCHFD-SHGTNISHLPGGYIDVFSVPSGVLAMSQQQLYHLHVAGSSMTVDLFAGNRS	278
	* : * : * * . . . : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	SQCYFFNGEDIVLDCNSRLLVIEEYEMYVTSRAHTMRALTLPVNLTAIFRGRPAFVG	358
<i>T. rangeli</i> SC58	LTCPPVVDGYAFATMCSNRRLFLVAENEMYLSDN--LSTVRVATLPPAIVPAQLPPSPFLG	337
<i>T. rangeli</i> Choachí	LTCPPVVDGYAFATMCSNRRLFLVAENEMYLSDN--LSTVRVATLPPAIVPAQLPPSPFLG	337
	* * * * * : * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	YPNTT-IMEQFVASLTEDVNKALGTNDSDVDPDSVRVDPDTWTNFTVTVVQQTFRDNTT	417
<i>T. rangeli</i> SC58	YPDAQVMPDIEVALMNKALNKLGTGSTYAPQNDHMVNDSTWTFDVLVQQADFVNVT	397
<i>T. rangeli</i> Choachí	YPDAQVMPDIEVALMNKALNKLGTGSTYAPQNDHMVNDSTWTFDVLVQQADFVNVT	397
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	-EKLRLSYTQTKTVDEYYGLTDEYVYIDTVLPVFPDDASLVTIQRLAREAGRALNFS	476
<i>T. rangeli</i> SC58	PEGVATNTFAAQRVATAYDRIDEALYMDTSIFFPCNATMMVAMHVLVSVMRKVLEFP	457
<i>T. rangeli</i> Choachí	PEGVATNTFAAQRVATAYDRIDEALYMDTSIFFPCNATMMVAMHVLVSVMRKVLEFP	457
	: : : . : . : : * * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	LVIADKPITFGSDVAENVAVTKLLMPHFSFKNATTPKQLSAANLTDFAHNLVKDLRASDTR	536
<i>T. rangeli</i> SC58	LIYANPPMRVTINGVANITRMKLLMPEPFSNETTHEIMAE LNANTALQDILRVEYGAANV	517
<i>T. rangeli</i> Choachí	LIYANPPTRTINDVANITRMKLLMPEPFSNDTHKIMAE LNANTALQDILRVEYGAANV	517
	* : * * * . . : . : * : * : * : * * * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	VDITFPDPFPNFSAVVPEREQEVRFVHVGKVMQLEICERLGSQGDAAVIAFADATARG	596
<i>T. rangeli</i> SC58	VLQVFPFPKDFSKLMPVQDMEVRV IQNMVNAQLETCKSIAPGGIAAGGNI--AA--	572
<i>T. rangeli</i> Choachí	VLQVFPFPKDFSKLMPVQDMEVRV IQNMVNAQLETCKSIAPGGIAAGGNI--AA--	569
	* : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	KANVTLNMTSGVKANDTVGPNPTNTTAGGANTTAAVAANGTAIVINVPSTNATPCTN	656
<i>T. rangeli</i> SC58	-----GG-----IAAGGDI-----AG-----	585
<i>T. rangeli</i> Choachí	-----IAAGGDI-----AG-----	579
	* : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	VTNTTTERAVVPVAPTQPSNGYACRSAITNRTETQNMEFFYDRKHRYEVFLPKKYDFNVS	716
<i>T. rangeli</i> SC58	-----DIAAGDGNSTCEAVITNRTQTVTRPPFNQNEYEYFVPHKYNFNVS	634
<i>T. rangeli</i> Choachí	-----DIAAGDGNSTCEAVITNRTQTVTRPPFNQNEYEYFVPHKYNFNVS	628
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	WCVDIIDWRDLEMLNRTDEVVEKSLSWCGHGCIIFAVVGSGLIAACLVVLAVLTSKR	776
<i>T. rangeli</i> SC58	RCLEGIWDPLEYLLNNYSAANTRHNPACNRGCIIGVAAVAVLTALIAIVVLTSKR	694
<i>T. rangeli</i> Choachí	RCLESIIDWDPLELLNNYTAANTRHNPACNRGCIIGVAAVAVLTALIAIVVLTSKR	688
	* : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. brucei</i>	RRLAAVAVPPPKFVSTVEDDDERVSNIIGVPLTDGKGTTAP---	818
<i>T. rangeli</i> SC58	KRLAAVAVPPPKFSTLDDDDDEEMTSN--PLEANNNEHALDORY	737
<i>T. rangeli</i> Choachí	KRLAAVAVPPPKFSTLDD--DEEMTSN--PLEANNNEHALDORY	730
	: * * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

A Fla3 de *T. rangeli* de ambas as cepas possui duas regiões hidrofóbicas, localizadas nas regiões N-terminal e C-terminal (Figura 9A) e possui sítios de glicosilação ao longo de sua sequência (Apêndice D). A predição de topologia da sequência indica um peptídeo sinal na região N-terminal, uma longa porção não citoplasmática e na porção C-terminal uma região transmembranar e uma pequena região citoplasmática (Figura 9B). As porções hidrofóbicas correspondem ao peptídeo sinal (porção N-terminal) e a porção transmembranar (porção C-terminal).

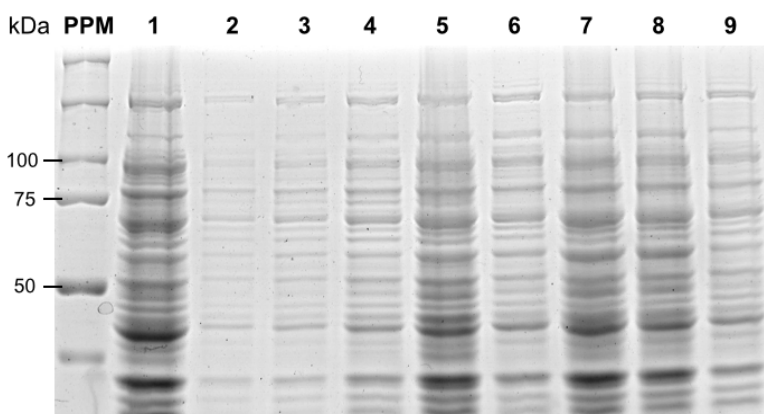
Figura 9 - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de *Trypanosoma rangeli*. A) Predição da hidrofobicidade de Fla3 de *T. rangeli*, representada pela sequência da cepa SC58, utilizando a ferramenta *ProtScale*. Pontuação acima de zero indica a hidrofobicidade do aminoácido. B) Predição da topologia transmembranar e do peptídeo sinal da Fla3 de *T. rangeli* (cepa SC58) utilizando a ferramenta *Phobius prediction*.



3.2.2 Expressão heteróloga da Fla3 de *T. rangeli*

Após a confirmação da identidade da *TrFla3* e da correta inserção no vetor de expressão, os plasmídeos pET47b contendo os insertos das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3) cálcio-competentes. A indução da expressão foi testada com diferentes condições e, após os tempos de indução e o padrão de proteínas foi visualizado através de eletroforese (Figura 10). Não foi observado o aparecimento de bandas proeminentes no tamanho esperado. Uma vez que o vetor pET14b insere uma cauda de histidina (His•Tag) na proteína recombinante, a ausência de expressão da Fla3 de ambas as cepas foi confirmada por *Western Blot*, utilizando-se o anticorpo primário anti-His•Tag (dado não mostrado).

Figura 10 - Avaliação da expressão da *TrFla3* recombinante por *Escherichia coli* BL21 DE3. Gel de poliacrilamida 8% corado com Coomassie Blue revelando o resultado da indução da expressão da *TrFla3* recombinante da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* em *E. coli* BL21 DE3; 1) controle não induzido (sem a adição de IPTG); 2) 15°C, 12 h; 3) 27°C, 3 h; 4) 27°C, 6 h; 5) 27°C, 12 h; 6) 37°C, 3 h; 7) 37°C, 6 h; 8) 37°C, 12 h; 9) controle do pET14b sem o inserto, induzido 37°C por 12 h. PPM - padrão de peso molecular (BIO-RAD).



Uma vez que não obtivemos a expressão da *TrFla3* recombinante, talvez em função da presença de códons raros (Quadro 4), da característica hidrofóbica da proteína (Figura 7A)

e a possível toxicidade da Fla3 para a bactéria, os plasmídeos contendo o gene da Fla3 foram utilizados para transformar outras três linhagens de *E. coli* BL21 (DE3): Codon Plus, Rosetta e pLysS. As bactérias das três linhagens foram transformadas e induzidas à expressão da proteína recombinante, novamente testando-se diferentes tempos (3 h, 6 h e 12 h) e temperaturas (15°C, 27°C e 37°) de indução, porém não tendo gerado nenhum resultado satisfatório. Com isso, concluiu-se não ser possível induzir a expressão da Fla3 recombinante nas condições testadas e optou-se pela expressão de fragmentos da Fla3 buscando perpassar os problemas acima apontados.

Quadro 4 - Número de códons raros na sequência do gene Fla3 de *T. rangeli*.

Códon Raro	Aminoácido Correspondente	Número de códons
AGG	Arginina	6
AGA	Arginina	2
AUA	Isoleucina	3
CUA	Leucina	5
CGA	Arginina	4
CGG	Arginina	7
CCC	Prolina	10

3.2.3 Amplificação e clonagem de fragmentos da Fla3 de *T. rangeli*

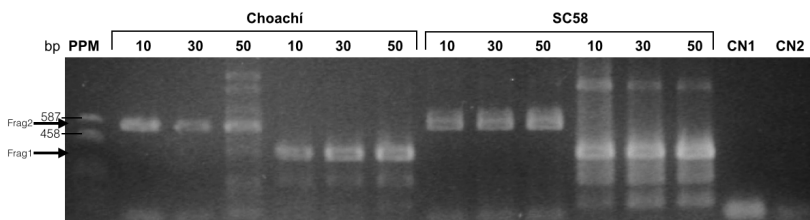
A escolha dos fragmentos a serem amplificados foi realizada evitando-se códons raros e as regiões que codificam para porções hidrofóbicas (Figura 11). O DNA genômico das cepas Choachí e SC58 foi diluído nas concentrações de 10, 30 e 50 ng/μl e a amplificação foi realizada com os iniciadores específicos para os fragmentos, utilizando-se como temperatura de ligação 58°C (Figura 12). As bandas com tamanho esperado foram observadas em todas as reações. É possível observar que em ambas as cepas a amplificação da *Tr*Fla3 Frag2 foi mais específica do que a amplificação de *Tr*Fla3 Frag1. Como as reações com 10 ng/μl tiveram menos bandas inespecíficas, optou-

se pelo uso dessa concentração de DNA genômico para a realização da clonagem dos fragmentos.

Figura 11 - Representação esquemática dos fragmentos da Fla3 de *T. rangeli* escolhidos para expressão heteróloga. Laranja - região correspondente ao peptídeo sinal. Cinza - região transmembranar. Verde - região correspondente ao fragmento 1. Azul - região correspondente ao fragmento 2.



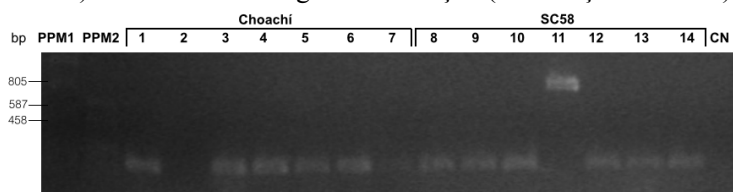
Figura 12 - Amplificação via PCR de *TrFla3_Frag1* e *TrFla3_Frag2* a partir de DNA genômico das cepas Choachí e SC58 de *Trypanosoma rangeli*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação dos fragmentos 1 (4-6; 10-12) e 2 (1-3; 7-9) da *TrFla3* das cepas Choachí e SC58 com 10 ng/μl (1), 30 ng/μl (2) e 50 ng/μl (3) de DNA genômico. PPM - padrão de peso molecular (pUC digerido com a enzima *HaeIII*). CN - Controle negativo da reação (sem adição de DNA). A seta indica o tamanho esperado para a amplificação (Frag1 - 417 pb; Frag2 - 599 pb).



Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T easy e a presença dos insertos verificada através de PCR diretamente das colônias. As colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido para a extração do DNA plasmidial. Os fragmentos 1 e 2 de cada cepa foram submetidos a subclonagem no vetor de expressão pET14b. Após a verificação da presença dos insertos através de PCR foi obtida apenas uma colônia contendo o fragmento *TrFla3_Frag2* da cepa SC58 (Figura 13).

Figura 13 - Amplificação via PCR diretamente das colônias dos fragmentos *TrFla3_Frag1* e *TrFla3_Frag2* submetidos a clonagem no vetor de expressão pET14b. Gel de agarose 1%

corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação dos fragmentos 1 (1-4; 8-10) e 2 (5-7; 11-14) da *TrFla3* das cepas Choachí e SC58 de *Trypanosoma rangeli*. Apenas a amostra 11 foi positiva. PPM1 - padrão de peso molecular 1 (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). PPM2 - padrão de peso molecular 2 (pUC18 digerido com a enzima *Hae*III). CN - Controle negativo da reação (sem adição de DNA).



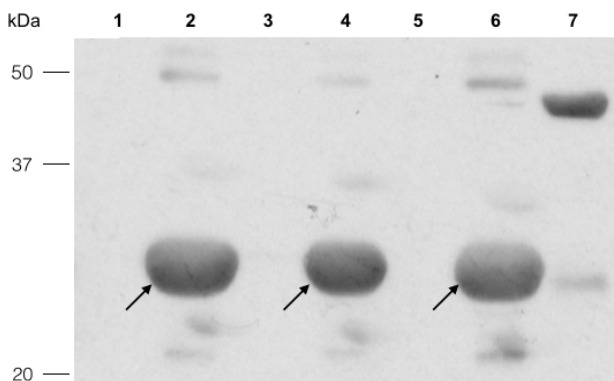
O clone contendo o inserto *TrFla3_Frag2* (cepa SC58) foi crescido para a extração do DNA plasmidial e sequenciado para confirmação da identidade do inserto e a sua correta inserção no plasmídeo de expressão.

3.2.4 Expressão heteróloga e purificação da *TrFla3_Frag2* de *Trypanosoma rangeli*

Diante da impossibilidade de clonar os demais fragmentos da *Fla3* e considerando a similaridade entre o fragmento 2 da *Fla3* das cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli*, este trabalho seguiu com a expressão apenas do fragmento 2 da cepa SC58. Ainda que tenha sido evitado sequências contendo códons raros durante o desenho dos iniciadores, o fragmento 2 os possui (1 CUA, 2 CGA, 2 AGG e 3 CCC). Sabendo disto, o plasmídeo pET14b contendo o inserto foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus.

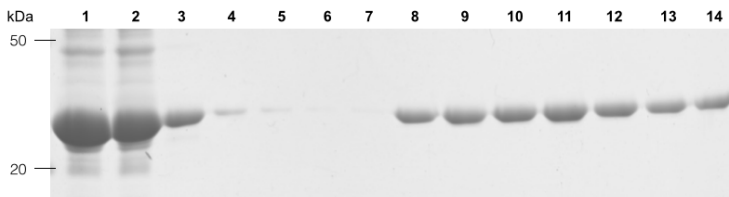
As bactérias foram induzidas à expressão do fragmento proteico recombinante testando-se diferentes tempos e temperaturas de indução. Em todas as condições testadas observou-se uma banda de aproximadamente 24,67 kDa correspondente ao tamanho previsto para o fragmento 2. As condições de 15°C por 16 h, 27°C por 3 h e 37°C por 3 h foram escolhidas para a obtenção das frações solúveis e insolúveis das proteínas, a fim de identificar a melhor condição de expressão da *TrFla3_Frag2*. Após a separação das frações através de eletroforese em géis de poliacrilamida a banda correspondente a *TrFla3_Frag2* (~24,67 kDa) esteve presente apenas nas porções insolúveis do extrato proteico bacteriano das distintas condições de expressão (Figura 14).

Figura 14 - Análise da expressão heteróloga do fragmento proteico *TrFla3_Frag2* da cepa SC58 de *Trypanosoma rangeli*. Western Blot realizado com o anticorpo anti-His•Tag revelando a expressão do fragmento proteico recombinante *TrFla3_Frag2* da cepa SC58 de *T. rangeli* em *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. 1) Fração Solúvel: 15°C 3 h; 2) Fração Insolúvel: 15°C 3 h; 3) Fração Solúvel: 27°C 3 h; 4) Fração Insolúvel: 27°C 3 h; 5) Fração Solúvel: 37°C 3 h; 6) Fração Insolúvel: 37°C 3 h; 7) Controle positivo: Arginina quinase recombinante (~40 kDa). Os retângulos pretos indicam a banda de interesse.



Com o intuito de purificar quantidades suficientes da proteína recombinante para os demais experimentos, um volume maior de cultura bacteriada foi induzido à expressão da proteína recombinante. Após a purificação pode-se observar que apesar de parte da proteína recombinante ter sido perdida por não ter se ligado a resina (*Flow through*) e nas duas primeiras lavagens, é possível observar a banda correspondente a *TrFla3_Frag2* recombinante em todas as sete eluições realizadas, assim como a pureza da proteína heteróloga (Figura 15).

Figura 15 - Purificação da *TrFla3_Frag2* recombinante. Análise da purificação da *TrFla3_Frag2* recombinante produzida em *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12% corado com Coomassie Blue. 1) Sobrenadante; 2) *Flow Through*; 3-7) Lavagens; 8-14) Eluições. As bandas de interesse estão destacadas pelo retângulo preto.



3.2.5 Produção e avaliação de antissoro policlonal anti-*TrFla3*

Após a imunização dos animais com a proteína purificada os soros obtidos nos dias da quarta e da quinta imunização foram testados através de *Western blot* em extratos totais de proteínas das formas epimastigotas ou tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli*. Com o soro obtido no dia da quarta imunização foi possível o reconhecimento do fragmento proteico recombinante (24,67 kDa), mas não foi observado o reconhecimento de bandas equivalentes a *TrFla3* nos extratos dos parasitos. No dia da quinta imunização houve um fraco reconhecimento de uma proteína correspondente a *TrFla3* nos extratos dos parasitos. Esta banda tem aproximadamente 100 kDa, tamanho superior aos 80,5 kDa previstos. Dez dias após a quinta imunização o soro dos animais foi coletado e novamente testado. Neste terceiro teste, houve o reconhecimento da *TrFla3* pelo soro dos quatro camundongos (Figura 16). Entretanto, apenas o soro do camundongo com maior reatividade para os extratos dos parasitos foi utilizado em seguida.

Para avaliar a presença da Fla3 nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, bem como investigar o reconhecimento do antissoro anti-*TrFla3* em outras espécies de parasitos o soro do camundongo 4 foi utilizado como anticorpo primário em um ensaio de *Western blot* (Figura 17). Houve o reconhecimento de uma banda de aproximadamente 100 kDa e outra de aproximadamente 250 kDa nas formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli*, mas em *T. cruzi* e *L. infantum* nenhuma proteína foi reconhecida, indicando uma possível especificidade do antissoro produzido para a Fla3 de *T. rangeli*.

Figura 16 - Avaliação do antissoro anti-*TrFla3*. *Western Blot* realizado com o antissoro anti-*TrFla3* revelando o reconhecimento do fragmento proteico recombinante *TrFla3*_Frag2 e da Fla3 em *Trypanosoma rangeli*. A, B, C e D correspondem aos quatro camundongos testados. 1) Tripomastigota e 2) Epimastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*.

3) *TrFla3_Frag2* recombinante. Os retângulos pretos indicam a banda correspondente ao tamanho estimado da *TrFla3*.

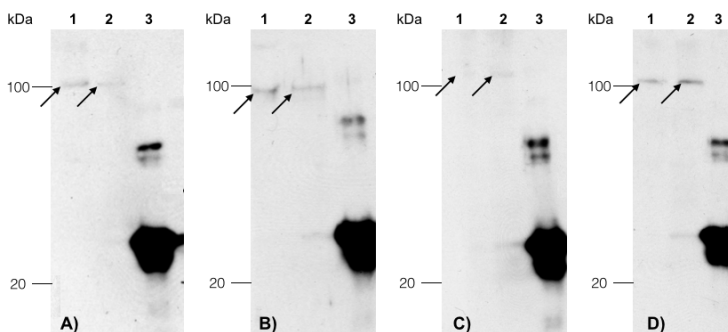
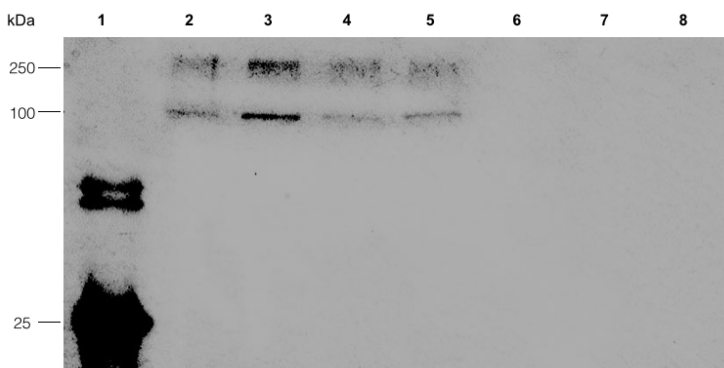


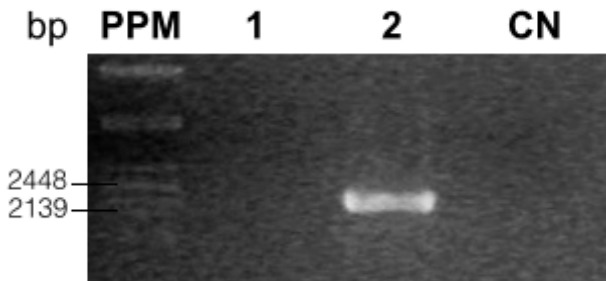
Figura 17 - Avaliação da expressão da Fla3 em extratos proteicos de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. Western Blot realizado com o antissoro anti-*TrFla3* revelando o reconhecimento da Fla3 em formas das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli*. 1) *TrFla3_Frag2* recombinante. 2) Epimastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*. 3) Tripomastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*. 4) Epimastigota da cepa SC58 de *T. rangeli*. 3) Tripomastigota da cepa SC58 de *T. rangeli*. 5) Epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*. 6) Tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi*. 7) Promastigota de *L. infantum*.



3.2.6 Amplificação, clonagem e análise da sequência do gene da Fla3 de *T. cruzi*

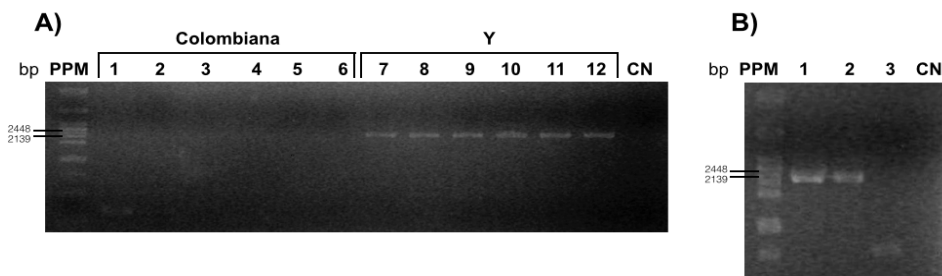
Como a porção final da sequência da Fla3 no genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* não está completamente sequenciada, foram desenhados iniciadores para a amplificação da ORF completa, além de outros iniciadores específicos para amplificação de dois fragmentos do gene. Para tanto, a sequência da Fla3 da cepa CL Brener de *T. cruzi*, haplótipo *Esmeraldo-Like* (TcCLB.503571.19) foi utilizada para o desenho de iniciadores visando a amplificação via PCR, o qual por sua vez é mais semelhante a Fla3 de *T. brucei* (36,58% de identidade), enquanto que a sequência do haplótipo *Non-Esmeraldo* TcCLB.509561.9 tem nível de identidade de 33,6% e é menor (366 aminoácidos a menos). O DNA genômico das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi* foi utilizado para a amplificação, onde observou-se uma única banda amplificada na cepa Y que corresponde ao tamanho esperado de aproximadamente 2.220 pb (Figura 18). Por outro lado, não houve amplificação alguma para a cepa Colombiana.

Figura 18 - Amplificação via PCR da *TcFla3* a partir de DNA genômico das cepas Colombiana e Y de *Trypanosoma cruzi*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação do gene Fla3 de *T. cruzi* das cepas Colombiana (1) e Y (2). PPM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). CN - controle negativo da reação (sem adição de DNA).



Na tentativa de amplificar a *TcFla3* na cepa Colombiana foram realizados dois testes para facilitar a ligação dos iniciadores. No primeiro, a amplificação foi realizada testando-se diferentes temperaturas de ligação: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62°C (Figura 19A). No segundo, os primeiros cinco ciclos da PCR tiveram temperatura de ligação de 45°C e os 30 ciclos restantes foram realizados com temperatura de pareamento de 56°C (Figura 19B). Apesar das distintas condições testadas não houve a amplificação da *TcFla3* da cepa Colombiana.

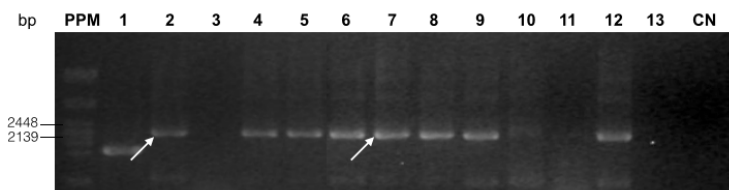
Figura 19 - Teste para a amplificação via PCR da *TcFla3* a partir de DNA genômico das cepas Colombiana e Y de *Trypanosoma cruzi*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação do gene Fla3 de *T. cruzi* das cepas Colombiana e Y com diferentes condições de ligação dos iniciadores. A) Teste com diferentes temperaturas de ligação dos iniciadores: 1 e 7 - 52°C, 2 e 8 - 54°C, 3 e 9 - 56°C, 4 e 10 - 58°C, 5 e 11 - 60°C e 6 e 12 - 62°C. B) Teste com temperatura de ligação de 45°C nos cinco primeiros ciclos e 56°C nos 30 ciclos restantes. 1 - Cepa Y- 56°C. 2 - Cepa Y. 3 - Cepa Colombiana. PPM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). CN - controle negativo da reação (sem adição de DNA).



Como não foi possível amplificar a *TcFla3* da cepa Colombiana apesar dos esforços realizados, os passos seguintes foram realizados apenas com a cepa Y. Uma vez que a amplificação da *TcFla3* da cepa Y resultou em uma banda única e não houve formação significativa de dímeros, o produto da amplificação foi ligado diretamente no vetor pGEM-T easy, sem a realização de purificação. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5α cálcio-competentes e as colônias brancas foram testadas quanto a presença do inserto através de PCR de colônia, utilizando-se os iniciadores específicos do vetor pGEM-T easy (M13). O resultado da amplificação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 20).

Figura 20 - Amplificação via PCR diretamente das colônias da *TcFla3* após clonagem em pGEM-T easy. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação do gene Fla3 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no vetor de clonagem pGEM-T easy. As amostras 2 e 7

foram selecionadas (seta branca). PPM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I). CN - controle negativo da reação (sem adição de DNA).



As colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido para a extração do DNA plasmidial. Com o intuito de obter-se a sequência completa da *TcFla3* da cepa Y o inserto foi sequenciado. A *TcFla3* da cepa Y corresponde a um gene de 2.136 pb, que codifica para uma proteína de 712 aminoácidos com peso molecular de 79,73 kDa. A sequência aminoacídica prevista da *TcFla3* da cepa Y é 99,15% idêntica a da cepa CL Brener. Quando alinhada com as sequências da *TcFla3* da cepa CL Brener e da *TbFla3* (Figura 21), é possível observar que as sequências de *T. cruzi* são menores que a de *T. brucei*, sendo a região C-terminal mais conservada entre as espécies. Além disso, é importante ressaltar que apesar da porção final da *TcFla3* da cepa CL Brener estar incompleta no banco de dados, foi possível identificar a sequência completa da cepa Y. É provável que a sequência da *Fla3* da cepa CL Brener possua a porção terminal bastante similar ao encontrado para a cepa Y.

Assim como a *TrFla3*, a *TcFla3* possui sítios de glicosilação ao longo de sua sequência (Apêndice D) e possui duas porções mais hidrofóbicas, localizadas nas extremidades N- e C-terminais (Figura 22A). Estas correspondem ao peptídeo sinal, situado na porção N-terminal, e a uma região transmembranar, situada na porção C-terminal (Figura 22B).

O DNA genômico das cepas Colombiana e Y também foi utilizado para a amplificação dos fragmentos 1 e 2 da *Fla3* (Figura 23). A reação foi realizada com temperatura de ligação de 58°C, testando-se as diluições de 10 ng/μl, 30 ng/μl e 50 ng/μl de DNA genômico. Como não houve diferença entre as diluições, o DNA foi amplificado na concentração de 30 ng/μl para a realização da clonagem no vetor pGEM-T easy (Figura 24). O resultado da amplificação foi uma banda única para todas as amostras, sendo o tamanho das bandas condizente com o esperado para cada fragmento (487 pb para fragmento 1 e 584 pb para fragmento 2).

T. brucei	MCFTIGVEMSNLAKRPM	LRKLQPLLILMIGIAFVAVCEIGAPVKLRPRVDVAGQGV	60
T. cruzi CL Brener	-----MSRFQRLPALFAGFLSFTASVVVAMPRLRWVETVSGITGS	-----MSRFQRLPALFAGFLSFTASVVVAMPRLRWVETVSGITGS	42
T. cruzi Y	-----MSRFQRLPALFAGFLSFTASVVVAMPRLRWVETVSGITGS	-----MSRFQRLPALFAGFLSFTASVVVAMPRLRWVETVSGITGS	42
T. brucei	EGETNGYPTNTALTEPYALCGRGTNDILVSGSNFRNYSKAKTKETGYTLAYNVGDSV--	EGETNGYPTNTALTEPYALCGRGTNDILVSGSNFRNYSKAKTKETGYTLAYNVGDSV--	118
T. cruzi CL Brener	IGHVWGPGTSLILRPAISACQGRNDELLFCTQGYFNRSSSTWGTGILLGDGTQILDG	IGHVWGPGTSLILRPAISACQGRNDELLFCTQGYFNRSSSTWGTGILLGDGTQILDG	102
T. cruzi Y	IGHVWGPGTSLILRPAISACQGRNDELLFCTQGYFNRSSSTWGTGILLGDGTQILDG	IGHVWGPGTSLILRPAISACQGRNDELLFCTQGYFNRSSSTWGTGILLGDGTQILDG	102
T. brucei	IGSGSTINPKRSCVRGEGNHTITTFYVDQDKLKYTVGGDVSFSGVSSGLAAVHVEG	IGSGSTINPKRSCVRGEGNHTITTFYVDQDKLKYTVGGDVSFSGVSSGLAAVHVEG	178
T. cruzi CL Brener	TWSQARIDGPRGCVRGFNQKIMVYFVEQGSSLRFTSNVHTVTISINLSFTDVKLYEG	TWSQARIDGPRGCVRGFNQKIMVYFVEQGSSLRFTSNVHTVTISINLSFTDVKLYEG	162
T. cruzi Y	TWSQARIDGPRGCVRGFNQKIMVYFVEQGSSLRFTSNVHTVTISINLSFTDVKLYEG	TWSQARIDGPRGCVRGFNQKIMVYFVEQGSSLRFTSNVHTVTISINLSFTDVKLYEG	162
T. brucei	TLIYTDQNNKSWACGLDGGAGKQPSCSEKKFTSV--DAKPEGIAVTSKGFIVTADSS	TLIYTDQNNKSWACGLDGGAGKQPSCSEKKFTSV--DAKPEGIAVTSKGFIVTADSS	238
T. cruzi CL Brener	KLYITEBQKDEWMSGDIDADGAPVSCALTKGFCK--IGYHGITVTKLGVFVVGESAA	KLYITEBQKDEWMSGDIDADGAPVSCALTKGFCK--IGYHGITVTKLGVFVVGESAA	219
T. cruzi Y	KLYITEBQKDEWMSGDIDADGAPVSCALTKGFCK--IGYHGITVTKLGVFVVGESAA	KLYITEBQKDEWMSGDIDADGAPVSCALTKGFCK--IGYHGITVTKLGVFVVGESAA	219
T. brucei	CALLWLMS--ENRRKMGVSGGFVDVFSSTEGVLYAAATEKELYTVTATDTSLSVTSFAGKNT	CALLWLMS--ENRRKMGVSGGFVDVFSSTEGVLYAAATEKELYTVTATDTSLSVTSFAGKNT	298
T. cruzi CL Brener	ISICHFDM--NKISVLGGNYDVFSLPDSLEYIMSYTLEHLRLVIGSAMVEKFAGRSD	ISICHFDM--NKISVLGGNYDVFSLPDSLEYIMSYTLEHLRLVIGSAMVEKFAGRSD	277
T. cruzi Y	ISICHFDM--NKISVLGGNYDVFSLPDSLEYIMSYTLEHLRLVIGSAMVEKFAGRSD	ISICHFDM--NKISVLGGNYDVFSLPDSLEYIMSYTLEHLRLVIGSAMVEKFAGRSD	277
T. brucei	SQCIFYPTNGDILVDCNSRLVIEEYEMVYTS--AHHTMRALTLPFAVNLTAIFRAGRPAVG	SQCIFYPTNGDILVDCNSRLVIEEYEMVYTS--AHHTMRALTLPFAVNLTAIFRAGRPAVG	358
T. cruzi CL Brener	ATCPPLIDGYDFTLKNLRLVIEEYEMSYLAT--NTVRASVTLPPAVNWIELPPPLPIG	ATCPPLIDGYDFTLKNLRLVIEEYEMSYLAT--NTVRASVTLPPAVNWIELPPPLPIG	336
T. cruzi Y	ATCPPLIDGYDFTLKNLRLVIEEYEMSYLAT--NTVRASVTLPPAVNWIELPPPLPIG	ATCPPLIDGYDFTLKNLRLVIEEYEMSYLAT--NTVRASVTLPPAVNWIELPPPLPIG	336
T. brucei	YPNTT-IMEGFVASLTEDVNKALGTNDSVDPDSVRVDPDTWETNFTFVQVTRFDNTE	YPNTT-IMEGFVASLTEDVNKALGTNDSVDPDSVRVDPDTWETNFTFVQVTRFDNTE	417
T. cruzi CL Brener	YPNDNEVKKKIQLMNEELNKHGLTNGTVSQETHMVDANTWATKFAVNVQQQDENAT	YPNDNEVKKKIQLMNEELNKHGLTNGTVSQETHMVDANTWATKFAVNVQQQDENAT	396
T. cruzi Y	YPNDNEVKKKIQLMNEELNKHGLTNGTVSQETHMVDANTWATKFAVNVQQQDENAT	YPNDNEVKKKIQLMNEELNKHGLTNGTVSQETHMVDANTWATKFAVNVQQQDENAT	396
T. brucei	E-KRLSYTYTQDKTVDEYYGLTDEYYIVDTVLVFPDCDASLVTIQRALAEAGRALNFS	E-KRLSYTYTQDKTVDEYYGLTDEYYIVDTVLVFPDCDASLVTIQRALAEAGRALNFS	456
T. cruzi CL Brener	PEGVLTTHFARTQFKVDYDRNVELYMDTSIMPFNCNDLNAVMHRLVTVREVLSFP	PEGVLTTHFARTQFKVDYDRNVELYMDTSIMPFNCNDLNAVMHRLVTVREVLSFP	456
T. cruzi Y	PEGVLTTHFARTQFKVDYDRNVELYMDTSIMPFNCNDLNAVMHRLVTVREVLSFP	PEGVLTTHFARTQFKVDYDRNVELYMDTSIMPFNCNDLNAVMHRLVTVREVLSFP	456
T. brucei	LVIADKPITFGSDVAENVATAVKLMPHSFKNATTPKGLSAANLTDFAHNVLKDLRASDTR	LVIADKPITFGSDVAENVATAVKLMPHSFKNATTPKGLSAANLTDFAHNVLKDLRASDTR	536
T. cruzi CL Brener	LIYANPEVKEKDFENITMTKLMPASFNNDTREALMDADMADALQLIRELYGPEHV	LIYANPEVKEKDFENITMTKLMPASFNNDTREALMDADMADALQLIRELYGPEHV	516
T. cruzi Y	LIYANPEVKEKDFENITMTKLMPASFNNDTREALMDADMADALQLIRELYGPEHV	LIYANPEVKEKDFENITMTKLMPASFNNDTREALMDADMADALQLIRELYGPEHV	516
T. brucei	VDITFPDPFPNFSVAVPERQEVKRVHVGKVMKQLEICERIGGGQDAVA--AAADATARG	VDITFPDPFPNFSVAVPERQEVKRVHVGKVMKQLEICERIGGGQDAVA--AAADATARG	596
T. cruzi CL Brener	VTLVFPMQVDFSKLDEQLVEVRKFLDLVRARLEECAVLSDVGAGVS	VTLVFPMQVDFSKLDEQLVEVRKFLDLVRARLEECAVLSDVGAGVS	566
T. cruzi Y	VTLVFPMQVDFSKLDEQLVEVRKFLDLVRARLEECAVLSDVGAGVS	VTLVFPMQVDFSKLDEQLVEVRKFLDLVRARLEECAVLSDVGAGVS	566
T. brucei	KANVLTNTSGVKANDVGFPNTNTTAGGANTANVAANGTANVINPNSNTATPGTTNAS	KANVLTNTSGVKANDVGFPNTNTTAGGANTANVAANGTANVINPNSNTATPGTTNAS	656
T. cruzi CL Brener	-----	-----	566
T. cruzi Y	-----	-----	566
T. brucei	VTNPTTARVPVAPTQ--SNGYACRSAITNRTQNTQMEPPYDRKHYEVFLPKKYDFNVS	VTNPTTARVPVAPTQ--SNGYACRSAITNRTQNTQMEPPYDRKHYEVFLPKKYDFNVS	716
T. cruzi CL Brener	-----SHSSVCVAIVNTRTTVSHPPNIQSEYEVFPYGRKFNAS	-----SHSSVCVAIVNTRTTVSHPPNIQSEYEVFPYGRKFNAS	609
T. cruzi Y	-----SHSSVCVAIVNTRTTVSHPPNIQSEYEVFPYGRKFNAS	-----SHSSVCVAIVNTRTTVSHPPNIQSEYEVFPYGRKFNAS	609
T. brucei	WCVDIIDWRDLDEMLNRTDEVEKLSWCHGHCIIAFAVVGSLAACVLVLAVALVLSKR	WCVDIIDWRDLDEMLNRTDEVEKLSWCHGHCIIAFAVVGSLAACVLVLAVALVLSKR	776
T. cruzi CL Brener	LCLOGDIWVLEELIKNYTEENKPRHRSACDRSCIGLAVLAALVLTALIAVNVLSKR	LCLOGDIWVLEELIKNYTEENKPRHRSACDRSCIGLAVLAALVLTALIAVNVLSKR	669
T. cruzi Y	LCLOGDIWVLEELIKNYTEENKPRHRSACDRSCIGLAVLAALVLTALIAVNVLSKR	LCLOGDIWVLEELIKNYTEENKPRHRSACDRSCIGLAVLAALVLTALIAVNVLSKR	669
T. brucei	RRLAAVVAPPRFKFVSTVEDDDRVSNGIPLVTDGKQ--TAH	RRLAAVVAPPRFKFVSTVEDDDRVSNGIPLVTDGKQ--TAH	818
T. cruzi CL Brener	RRLAAVVAPVPHFKFVSTDEDEEEMETNPLVLEKDEQRA--	RRLAAVVAPVPHFKFVSTDEDEEEMETNPLVLEKDEQRA--	708
T. cruzi Y	RRLAAVVAPVPHKIKSTDEDEEEMETNPLVLEKDEQRA--	RRLAAVVAPVPHKIKSTDEDEEEMETNPLVLEKDEQRA--	712

Figura 22 - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de *Trypanosoma cruzi*. A) Predição da hidrofobicidade de Fla3 de *T. cruzi* (cepa Y) utilizando a ferramenta *ProtScale*. Pontuação acima de zero indica a hidrofobicidade do aminoácido. B) Predição da topologia transmembranar e do peptídeo sinal da Fla3 de *T. cruzi* (cepa Y) utilizando a ferramenta *Phobius prediction*.

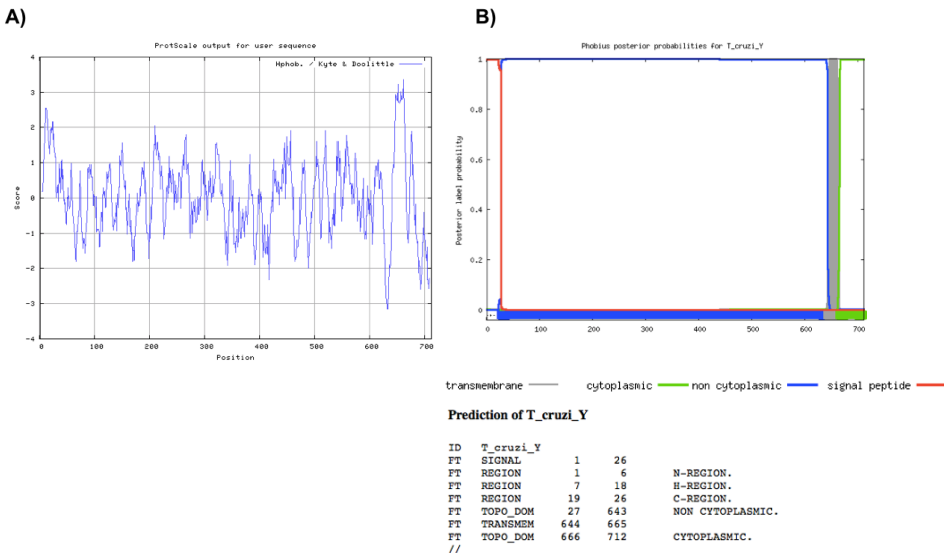
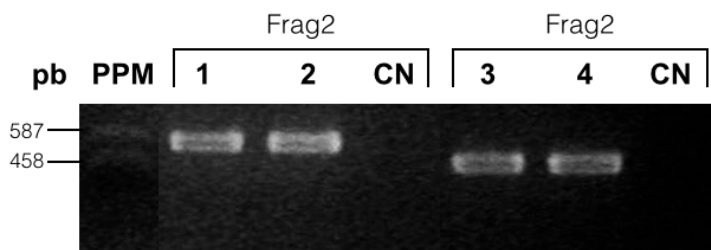


Figura 23 - Representação esquemática dos fragmentos da Fla3 de *T. cruzi* escolhidos para expressão heteróloga. Laranja - região correspondente ao peptídeo sinal. Cinza - região transmembranar. Verde - região correspondente ao fragmento 1. Azul - região correspondente ao fragmento 2.



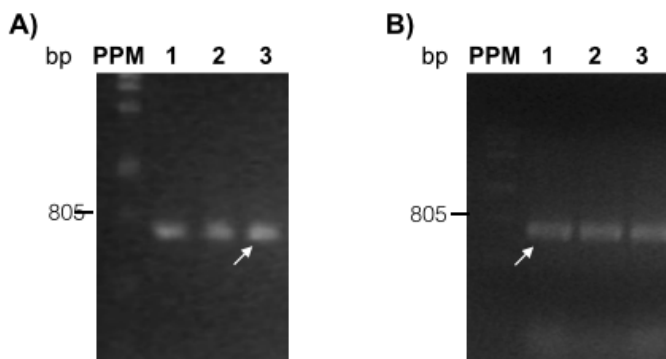
Figura 24 - Amplificação via PCR dos fragmentos *TcFla3_Frag1* e *TcFla3_Frag2* do gene Fla3 das cepas Colombiana e Y de *Trypanosoma cruzi*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da

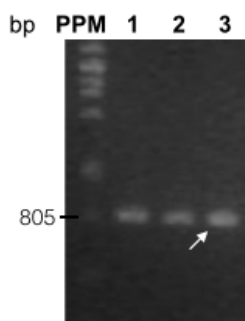
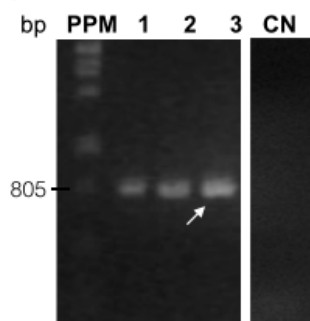
amplificação dos fragmentos 1 e 2 da *TcFla3* das cepas do Colombiana (1, 3) e Y (2, 4) de *T. cruzi*. PPM - padrão de peso molecular (pUC18 digerido com a enzima *Hae*III). CN - controle negativo de cada reação (sem adição de DNA).



Como não houve excesso de dímeros e bandas inespecíficas, o produto da amplificação foi ligado diretamente ao vetor de clonagem pGEM-T easy e o produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α cálcio-competentes. A presença do inserto foi confirmada através de PCR diretamente das colônias (Figura 23).

Figura 23 - Amplificação via PCR diretamente das colônias dos fragmentos *TcFla3*_Frag1 e *TcFla3*_Frag2 após clonagem em pGEM-T easy. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando o produto da amplificação dos fragmentos 1 (A, B) e 2 (C, D) da *TcFla3* das cepas Colombiana (A, C) e Y (B, D) de *T. cruzi*. As amostras selecionadas estão destacadas com seta branca. PPM - padrão de peso molecular (pUC18 digerido com a enzima *Hae*III). CN - controle negativo (sem adição de DNA).



C)**D)**

4. DISCUSSÃO

A FAZ de *T. brucei* é composta de cerca de 30 proteínas que possuem uma complexa interação entre si, a qual permanece pouco elucidada. Na busca por proteínas ortólogas as proteínas da FAZ de *T. brucei*, observou-se uma redução tanto para *T. cruzi* quanto para *T. rangeli* no número de genes codificantes para estas proteínas, tendo sido reconhecidas sequências que correspondem a 25 proteínas em *T. cruzi* e 25 proteínas em *T. rangeli*. Esta redução no número de proteínas envolvidas na adesão flagelar já havia sido relatada em um estudo *in silico* da FAZ de *Leishmania mexicana* (SUNTER; GULL, 2016; WHEELER; SUNTER; GULL, 2016).

Nota-se que o perfil de proteínas da FAZ presentes em *T. cruzi* e *T. rangeli* é bastante semelhante. Com exceção da FAZ13 (presente exclusivamente em *T. rangeli*) e da FAZ10 (presente apenas em *T. cruzi*), as demais proteínas encontradas estão presentes nas duas espécies. Entretanto, é possível observar uma grande diferença entre os haplótipos EL e NEL de *T. cruzi*, sendo que sete proteínas possuem ortólogos apenas em um dos haplótipos. A existência de dois haplótipos na cepa CL Brener já havia sido confirmada com o sequenciamento do genoma desta cepa, onde observou-se a existência de um haplótipo derivado de um ancestral da linhagem TcII (EL), e outro da linhagem TcIII (NEL) (EL-SAYED et al., 2005).

Quanto às proteínas FID, *T. cruzi* e *T. rangeli* possuem cada uma única proteína correspondente a *TbFla1/TbFla2/TbFla3* e outra correspondente a *TbFla1BP/TbFla3*, sendo este o mesmo padrão descrito para *L. mexicana* (WHEELER; SUNTER; GULL, 2016). Em *T. brucei*, essas proteínas são consideradas estágio-específicas, sendo Fla1 e Fla1BP mais expressas nas formas procíclicas, enquanto que Fla2/Fla3 (SUN et al., 2013), assim como a Fla3 descrita por Woods et al. (2013), são mais expressas nas formas sanguíneas. Sun et al. (2013) demonstraram a interação entre Fla1 e Fla1BP nas formas procíclicas de *T. brucei*, apontando que de um modo similar ocorra a interação entre Fla2/Fla3 e a segunda Fla3 em função da alta identidade entre estas proteínas. Ainda que tenhamos observado uma redução do número destas proteínas em *T. cruzi* e *T. rangeli*, é possível que as proteínas correspondentes a Fla1/Fla2/Fla3 e a Fla1BP/Fla3 interajam nestes parasitos de forma semelhante ao descrito para *T. brucei*, mas que esta interação ocorra durante todo o ciclo de vida do parasito, uma vez que estas proteínas em *T. brucei* são importantes para a vida deste parasito e a *TrFla3* foi identificada nas formas epimastigotas e tripomastigotas neste trabalho.

As proteínas *TbFla1*, *TbFla2*, *TbFla3*, *TbFla1BP* e *TbFla3* possuem o domínio NHL (SUN et al., 2013; SUNTER; GULL, 2016; WOODS et al., 2013). Entretanto, em uma análise realizada utilizando-se o RPS-BLAST, este domínio foi encontrado somente nas proteínas *TbFla1*, *TbFla2*, *TbFla3* e *TbFla3* do *T. brucei*. Nesta análise observamos que em *T. cruzi* e em *T. rangeli* o domínio NHL foi encontrado apenas na sequência ortóloga a *TbFla1*, *TbFla2* e *TbFla3*. Apesar de descrito por Sun et al. (2013) como um domínio importante para a interação entre Fla1 e Fla1BP, o domínio NHL não possui um arranjo de aminoácidos muito preciso: ele é caracterizado pela repetição de duas a seis sequências com aproximadamente 44 aminoácidos ricas em glicina e resíduos hidrofóbicos, além da presença de um agrupamento de resíduos com carga (normalmente aspartato, asparagina, histidina e arginina) próximo da região C-terminal (SLACK; GARY, 1998). Devido a esta imprecisão, é possível que não tenha sido possível reconhecer o domínio em todas as sequências através de uma análise por RPS-BLAST devido a sensibilidade do algoritmo e a imprecisão do domínio NHL.

Em *T. cruzi*, a sequência ortóloga a *TbFla1/TbFla2/TbFla3* (TcCLB.503571.10/TcCLB.509561.20) é denominada de Gp72, primeira proteína descrita com papel na adesão flagelar do gênero *Trypanosoma*. Apesar de diversos trabalhos se referirem a Gp72 como uma proteína estágio específica encontrada apenas nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (COOPER; DE JESUS; CROSS, 1993; FERGUSON; ALLEN; SNARY, 1983), Haynes e Cross (1996) demonstraram a presença da Gp72 com os mesmos níveis de expressão todos os estágios de vida do parasito. Neste trabalho, os autores observaram que o anticorpo utilizado para o reconhecimento da Gp72 nos trabalhos anteriores (WIC29.26) reconhece um tipo específico de glicosilação em formas epimastigotas, sendo que a ausência de reconhecimento desta proteína nos demais estágios de vida seria decorrente de glicosilações diferenciais durante o ciclo de vida do parasito.

Além disso, as sequências TcCLB.504835.29, TcCLB.509911.130 de *T. cruzi* e TRSC58_02099 de *T. rangeli* revelaram ser ortólogas tanto da FAZ11 quanto da FAZ14 de *T. brucei*. Resultado similar também foi encontrado para *L. mexicana* por Wheeler, Sunter e Gull (2016), que atribuíram este resultado a alta identidade (77,0%) entre *TbFAZ11* e *TbFAZ14*.

Algumas proteínas mantiveram os domínios conservados mesmo com identidades entre 27-36%. Isto foi observado para as proteínas FAZ6, *TbVAP* e FAZ16 em *T. cruzi* e *T. rangeli*. Apesar de não estar claro o papel de cada uma destas proteínas no

processo de adesão flagelar, o domínio WD (código de acesso cl25539 do NCBI) conservado na FAZ6 tem como função a ordenação do citoesqueleto e em diversos aspectos da divisão celular (SMITH et al., 1999). Portanto, mesmo com a divergência entre as sequências encontradas em *T. cruzi* e *T. rangeli* em relação às proteínas de *T. brucei*, é provável que estas tenham mantido suas funções no processo de adesão flagelar.

Enquanto que algumas proteínas apresentam baixa identidade em relação às proteínas da FAZ de *T. brucei*, as sequências ortólogas as *TbKMP11* são altamente conservadas. A análise dos genomas permite observar um aumento do número de cópias de genes que codificam KMP11 tanto em *T. cruzi* (40 cópias gênicas) quanto em *T. rangeli* (148 cópias gênicas) (DIEZ et al., 2005, 2008; STOCO et al., 2014; THOMAS et al., 2000). Thomas et al. (2000) encontraram a KMP11 em um *locus* formado por quatro sequências agrupadas, o que difere das cinco sequências encontradas neste trabalho em *T. cruzi* (duas em EL e três em NEL). Entretanto, esta diferença no número de genes pode estar atribuída ao status híbrido da cepa CL Brener de *T. cruzi* e/ou à plasticidade genômica das diferentes linhagens genéticas do parasito (*Discrete Typing Units* - DTU), uma vez que estes autores utilizaram a cepa Y do parasito. Em *T. cruzi*, esta proteína está localizada principalmente na bolsa flagelar, mas também está presente no citoesqueleto do parasito (THOMAS et al., 2000).

Em *T. rangeli*, Diez et al. (2005) haviam descrito inicialmente quatro genes codificantes para a KMP11 mas a análise do genoma da cepa SC58 do parasito revelou um número de 148 cópias, sendo quase quatro vezes maior do que o número de genes em *T. cruzi* (STOCO et al., 2014). Em *T. rangeli* estes genes também se encontram localizados agrupados e codificam para uma proteína que se localiza principalmente no citoplasma, superfície celular, flagelo e bolsa flagelar (DIEZ et al., 2008). Esta localização é semelhante ao descrito para *T. brucei*, o qual possui a KMP11 localizada principalmente no corpo celular, flagelo e corpo basal (LI; WANG, 2008; SUNTER; GULL, 2016).

4.1 FLA3 DE *T. rangeli*

Visto que as sequências TcCLB.503571.19, TcCLB.509561.9 (*T. cruzi*) e TcRangeli-21_41580_43793 (*T. rangeli*) foram encontradas como ortólogas da Fla1BP/Fla3 e que não foram observadas diferenças de identidade na comparação com *TbFla1BP* e *TbFla3*, optou-se pelo uso do nome Fla3 para a

descrição desta proteína neste trabalho pois não há indícios até o momento de interação entre essa proteína e a suposta *TrFla1*, proteína ortóloga à Gp72 de *T. cruzi*.

O gene da Fla3 de *T. rangeli* possui 2.193 pb na cepa Choachí e 2.214 pb na cepa SC58, que codificam para proteínas de 730 e de 737 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Nota-se que apesar da diferença de sete aminoácidos entre a Fla3 das cepas Choachí e SC58, as duas são altamente conservadas. Esta proteína possui um peptídeo sinal na região N-terminal e uma região transmembrantar na região C-terminal, sendo a maior parte da proteína localizada fora do citoplasma e uma pequena parte intracelular. É possível que a região exposta para fora da membrana celular seja a região de interação entre a *TrFla3* e a suposta *TrFla1*.

Ao descrever a Fla3 em *T. brucei*, Woods et al. (2013) descreveram uma segunda região transmembrantar, localizada na porção N-terminal, logo em seguida do peptídeo sinal. Esta região não foi encontrada nas análises *in silico* da Fla3 de *T. rangeli*. Com o alinhamento das sequências aminoacídicas da Fla3 de *T. rangeli* e *T. brucei* observamos uma grande diferença entre as duas espécies, porém existindo aminoácidos idênticos e similares ao longo de toda a sequência. A região C-terminal é a que manteve a maior parte da sua sequência aminoacídica conservada, o que condiz com a preservação da região transmembrantar na *TrFla3*.

A fim de confirmar a expressão da *TrFla3* e poder realizar estudos de citolocalização e níveis de expressão, a ORF completa da *TrFla3* foi subclonada em vetor de expressão para a produção da proteína recombinante e posterior produção de anticorpos anti-*TrFla3*. Entretanto, mesmo com as diferentes condições de temperatura e tempos de indução testados, não foi possível a expressão em bactérias BL21 (DE3) de forma a obter a quantidade e a pureza necessárias. A dificuldade ou impossibilidade de expressar uma proteína recombinante em bactérias pode ter diferentes causas, sendo as mais comuns a presença de códons raros (KANE, 1995), hidrofobicidade e/ou a toxicidade da proteína recombinante para a bactéria (WAGNER et al., 2006).

Proteínas com códons raros são difíceis de expressar devido à diferença do uso de determinados códons por organismos procariontes e eucariontes. De acordo com Kane (1995), a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é prejudicada pela presença de sete códons, sendo os sete encontrados na Fla3 de *T. rangeli*. Uma alternativa para a

expressão de proteínas com estes códons é o uso das linhagens de bactérias BL21 (DE3) Codon Plus e BL21 (DE3) Rosetta, as quais possuem genes que expressam RNA transportadores para alguns destes códons. O uso de ambas foi testado neste trabalho, entretanto, não foi possível a expressão da proteína recombinante.

Considerando a possibilidade da Fla3 ser tóxica para a bactéria, a linhagem BL21 (DE3) pLysS também foi utilizada. Esta linhagem expressa uma lisozima que inibe a transcrição da proteína recombinante através da inibição da RNA polimerase T7. Desta forma, a ativação da expressão da proteína recombinante passa a ser mais controlada, reduzindo o efeito tóxico (MOFFATT; STUDIER, 1987; SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Ainda assim, não foi possível a expressão da proteína recombinante utilizando esta linhagem bacteriana.

Uma alternativa para obter a expressão heteróloga de proteínas tóxicas ou de difícil expressão heteróloga com vistas à produção de antissoros ou de anticorpos monoclonais é a clonagem e expressão de apenas uma parte da proteína, evitando-se assim os problemas citados acima. Deste modo, dois fragmentos de cada sequência foram escolhidos para a clonagem e expressão heteróloga. Dentre os dois fragmentos escolhidos, obtivemos sucesso utilizando o fragmento 2 da Fla3 da cepa SC58.

Apesar de ter sido evitado clonar sequências que contivessem códons raros, o fragmento *Tr*Fla3_Frag2 ainda os possui. À vista disso, foi utilizada a linhagem de bactéria BL21 (DE3) Codon Plus para facilitar sua expressão heteróloga. Não houve diferenças visíveis entre os tempos de indução para a separação das frações solúveis e insolúveis, então o tempo de 3 h a 37°C foi escolhido. Sabendo que o fragmento proteico recombinante *Tr*Fla3_Frag2 estava presente na fração insolúvel, utilizou-se o protocolo adequado para a purificação de proteínas recombinantes nesta fração. A purificação foi confirmada através da visualização por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e, após a confirmação, as proteínas foram quantificadas para a imunização de camundongos Balb/C.

O soro dos camundongos imunizados reconheceu uma proteína de aproximadamente 24,67 kDa, sendo consistente com o tamanho previsto da *Tr*Fla3_Frag2 purificado, além de duas outras proteínas (100 e 250 kDa) nos extratos de formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Choachí e SC58. Por outro lado, não houve o reconhecimento de nenhuma proteína nos extratos de *T. cruzi* e de *L. infantum*. Apesar de o fragmento proteico recombinante ter sido produzido com base na sequência

da cepa SC58, houve o reconhecimento nas duas cepas de *T. rangeli*. Por outro lado, a Fla3 de *T. rangeli* tem aproximadamente 37,0% de identidade com Fla3 de *T. brucei* e entre 58,0-54,0% com a Fla3 de *T. cruzi*, o que indica uma grande diferença entre espécies. Isto pode ter dificultado o reconhecimento pelo antissoro anti-*Tr*Fla3 da Fla3 nas espécies de tripanosomatídeos utilizadas.

Apesar do tamanho previsto para a Fla3 de *T. rangeli* ter sido de 80,5 kDa, houve o reconhecimento das bandas de 100 e 250 kDa. Woods et al. (2013) também observaram diferença entre o tamanho esperado (83 kDa) e o observado (160 kDa) para a Fla3 de *T. brucei*. Apesar de ter sido observada apenas uma banda, Woods e colaboradores atribuem esta diferença de tamanho a N-glicosilações que a *Tb*Fla3 sofre pós-traducionalmente (Apêndice D), assim como a presença de regiões transmembranares. Estas duas características foram observadas na *Tr*Fla3. Portanto, a discrepância entre tamanho esperado e observado para a *Tr*Fla3 pode estar igualmente relacionada a estas características da proteína. Além disto, a banda de 250 kDa pode estar relacionada à formação de dímeros, interação com outras proteínas, reconhecimento de bandas inespecíficas ou até mesmo a diferentes modificações pós-tradução.

4.2 FLA3 DE *T. cruzi*

Foram encontradas duas sequências correspondentes a Fla3 de *T. cruzi*, TcCLB.503571.19 (EL) e TcCLB.509561.9 (NEL). A sequência de EL corresponde a uma proteína de 708 aminoácidos com peso molecular previsto de 79.25 kDa, enquanto que a sequência de NEL corresponde a uma sequência de 366 aminoácidos com peso molecular previsto de 40.65 kDa. Portanto, a sequência de EL foi escolhida para as demais análises, uma vez que esta se assemelha mais a *Tb*Fla3, a qual possui 818 resíduos aminoácidos e massa molecular 160 kDa (apesar do previsto ser de 83 kDa) (WOODS et al., 2013).

A *Tc*Fla3 da cepa Y diz respeito a um gene de 2.136 pb, que codifica para uma proteína de 712 aminoácidos com peso molecular de 79.73 kDa. Estes valores são bastante semelhantes ao encontrado para o haplótipo EL de CL Brener, apesar da porção final da *Tc*Fla3 da desta cepa não estar completa no banco de dados. Com o sequenciamento da *Tc*Fla3 da cepa Y, foi possível obter a porção final deste gene para esta cepa. Considerando a similaridade entre as sequências da *Tc*Fla3 de

ambas as cepas, é possível que o final da *TcFla3* da cepa CL Brener seja bastante semelhante ao encontrado na cepa Y.

Como dito anteriormente, optou-se pelo termo Fla3 ao invés de Fla1BP para estas sequências. A TcCLB.503571.19 tem 37.42% de identidade em relação a Fla1BP e 36.58% em relação a Fla3. Apesar desta pequena diferença nos níveis de identidade, Sun et al. (2013) afirma que *T. cruzi* possui uma proteína ortóloga a Fla1BP, mas não ortóloga a Fla3. No entanto, a predição de topologia da sequência de *T. cruzi* é semelhante para as duas proteínas, *TbFla3* e *TbFla1BP*. A *TcFla3* possui uma região N-terminal com peptídeo sinal, uma longa porção não citoplasmática e uma região C-terminal com região transmembranar e uma pequena região intracelular (SUN et al., 2013; WOODS et al., 2013).

Uma vez que não houve o reconhecimento da Fla3 de *T. cruzi* com o anticorpo anti-*TrFla3_Frag2*, é necessário produzir um anticorpo específico para um dos fragmentos de *T. cruzi*. Estes fragmentos estão clonados no vetor de clonagem pGEM-T easy e serão futuramente subclonados em vetor de expressão para a produção das proteínas recombinantes.

5. CONCLUSÕES

As análises *in silico* indicam uma redução do número de proteínas da FAZ de *T. cruzi* e *T. rangeli*, tendo sido reconhecidas 25 proteínas em ambas as espécies. O padrão de proteínas entre ambas é bastante conservado, mas observa-se uma grande diferença entre os haplótipos Esmeraldo-Like e Non-Esmeraldo-Like de CL-Brener. Algumas proteínas que em *T. brucei* são estágio-específicas (Fla1, Fla2, Fla3, Fla1BP e Fla3) aparentam ser expressas durante todo o ciclo de vida de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

O sequenciamento da Fla3 de *T. rangeli* indica diferenças entre cepas. A Fla3 da cepa SC58 corresponde a um gene de 2214 pb, que codifica para uma proteína de 737 aminoácidos com peso molecular previsto de 80,5 kDa. Por outro lado, a Fla3 da cepa Choachí corresponde a uma proteína de 730 aminoácidos, com peso molecular de 80,05 kDa. A Fla3 de *T. rangeli* é uma proteína com um peptídeo sinal localizado na porção N-terminal, uma longa porção localizada fora do citoplasma e com uma porção transmembranar e uma região intracelular na porção C-terminal.

Uma vez que a expressão heteróloga da ORF da Fla3 de *T. rangeli* não foi possível nas condições testadas, um fragmento da cepa SC58 foi expresso, sendo este fragmento proteico recombinante purificado das frações insolúveis do extrato bacteriano. O fragmento proteico recombinante purificado foi utilizado para a produção de soro policlonal, que reconheceu, além do fragmento proteico recombinante proteína recombinante purificado, duas bandas nos extratos de epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* (cepa Choachí e SC58). Estas bandas correspondem ao tamanho de 100 e 250 kDa.

A presença da Fla3 nas formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito indica que, diferente do observado para a Fla3 de *T. brucei*, a Fla3 de *T. rangeli* não é estágio específica. Além disso, a diferença de tamanho esperado (80,05 kDa) e obtido (100 kDa) para a Fla3 de *T. rangeli* pode estar relacionada a glicosilações pós-tradução.

Por outro lado, apenas a Fla3 da cepa Y de *T. cruzi* pode ser amplificada. Ela corresponde a um gene de 2,136 pb. Este gene codifica para uma proteína de 712 aminoácidos e peso molecular 79,73 kDa. Fragmentos da *TcFla3* das cepas Colombiana e Y foram clonados no vetor pGEM e serão futuramente subclonados em vetor de expressão para a produção de fragmentos proteicos recombinantes e geração de soro policlonal anti *TcFla3*.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho possibilitou a identificação de novos genes relacionados a proteínas da zona de adesão flagelar de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Apesar destas duas espécies manterem um perfil de proteínas bastante semelhante ao descrito para *T. brucei*, ambas apresentam uma redução do número de proteínas da FAZ, além de diferenças no tamanho destas proteínas e nas sequências aminoacídicas. Portanto, será necessário a caracterização molecular destas proteínas, bem como estudos de citolocalização, níveis de expressão e estudos funcionais, a fim de avaliar se as funções das proteínas da FAZ de *T. cruzi* e *T. rangeli* foram preservadas em relação ao descrito para *T. brucei*.

A caracterização molecular da Fla3 de *T. rangeli* sugere que, diferente do descrito para *T. brucei*, esta proteína não é estágio específica. Ainda são necessários estudos de níveis de expressão, citolocalização e estudos funcionais, para investigar o papel desta proteína na adesão flagelar.

Quanto ao *T. cruzi*, será necessário subclonar os fragmentos em vetores de expressão para a produção de fragmentos proteicos recombinantes e posterior produção de soro policlonal anti-Fla3. Além de estudos de caracterização molecular e funcional da Fla3 de *T. cruzi*, será possível estudar a interação entre esta proteína e a Gp72 (proteína ortóloga à *TbFla1*), uma vez que existem anticorpos anti-Gp72.

REFERÊNCIAS

- AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **Parasitology**, v. 65, n. 4, p. 507–514, 1979.
- AÑEZ, N.; EAST, J. S. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. **Acta Tropica**, v. 41, n. 1, p. 93–5, 1984.
- BASOMBRÍO, M. A. et al. Targeted deletion of the Gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 489–493, 2002.
- BASTIN, P. et al. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 15, p. 1865–1874, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- COOPER, R. et al. Characterization of a candidate gene for Gp72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 45–59, nov. 1991.
- COOPER, R.; DE JESUS, A. R.; CROSS, G. A. M. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 149–156, 1993.
- CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 207–220, 1998.
- D’ALESSANDRO, A.; SARAIVA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: **Parasitic Protozoa**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 1992. p. 1–45.
- DE LANA, M.; TAFURI, W. T. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: **Parasitologia Humana**. [s.l.] Atheneu, 2002.
- DIEZ, H. et al. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 130, n. 6, p. 643–651, 2005.
- DIEZ, H. et al. Cellular location of KMP-11 protein in *Trypanosoma rangeli*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 1, p. 93–96, 2008.
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas Disease. v. 4975, n. July, p. 409–415, 2005.

- FERGUSON, M. A.; ALLEN, A. K.; SNARY, D. Studies on the structure of a phosphoglycoprotein from the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 213, n. 2, p. 313–319, 1983.
- GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203–209, 1999.
- GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118, p. 375–382, 1999.
- GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: **Parasitologia Humana**. [s.l.] Atheneu, 2002.
- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 - An Updated Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435–442, 2003.
- HAYNES, P. et al. Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. **The Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 3, p. 377–384, 2014.
- HAYNES, P. A.; CROSS, G. A. M. Differential glycosylation of epitope-tagged glycoprotein Gp72 during the *Trypanosoma cruzi* life cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 253–256, 1996.
- HENDRICKS, L.; WRIGHT, N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 6, p. 962–964, 1979.
- HU, H.; ZHOU, Q.; LI, Z. SAS-4 in *Trypanosoma brucei* controls life cycle transitions by modulating the length of the flagellum attachment zone filament. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 30453–30463, 2015.
- KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 494–500, 1995.
- KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 1, p. 21–25, 2002.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 1982.
- LACOMBLE, S. et al. A *Trypanosoma brucei* protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains. **Protist**, v. 163, n. 4, p. 602–615, 2012.

- LACOUNT, D. J.; BARRETT, B.; DONELSON, J. E. *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17580–17588, 2002.
- LANGOUSIS, G.; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 505–518, 2014.
- LI, Z.; WANG, C. C. KMP-11, a basal body and flagellar protein, is required for cell division in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 11, p. 1941–1950, 2008.
- MCALLASTER, M. R. et al. Proteomic identification of novel cytoskeletal proteins associated with TbPLK, an essential regulator of cell morphogenesis in. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 17, p. 1–56, 2015.
- MOFFATT, B. A.; STUDIER, W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. **Cell**, v. 49, p. 221–227, 1987.
- MORAES, M. H. DE et al. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites and Vectors**, v. 10, p. 1–10, 2008.
- MORRISWOOD, B. et al. Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 356–367, 2013.
- NOZAKI, T.; HAYNES, P. A.; CROSS, G. A. Characterization of the *Trypanosoma brucei* homologue of a *Trypanosoma cruzi* flagellum-adhesion glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 245–255, 1996.
- OBERHOLZER, M. et al. Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2011.
- ROTUREAU, B. et al. Flagellar adhesion in *Trypanosoma brucei* relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 1, p. 204–215, 2014.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- SLACK, F. J.; GARY, R. A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. **Protein Sequence Motifs**, v. 23, n. 12, p. 474–475, 1998.
- SMITH, T. F. et al. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 181–185, 1999.

- SNARY, D. et al. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 3, n. 6, p. 343–356, 1981.
- STOCO, P. H. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome—*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3176, 18 set. 2014.
- SUN, S. Y. et al. An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 2, p. 520–531, 2013.
- SUNTER, J. D. et al. A dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 8, p. 1580–1594, 2015.
- SUNTER, J. D.; GULL, K. The flagellum attachment zone: “the cellular ruler” of trypanosome morphology. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 309–324, 2016.
- THOMAS, M. C. et al. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. **DNA and Cell Biology**, v. 19, n. 1, p. 47–57, 2000.
- URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **Journal of Parasitology**, v. 71, n. 4, p. 409–414, 1985.
- VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae – *Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli* : Vector – parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137–147, 2009.
- VASQUEZ, A. M. et al. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 217–222, 2004.
- VAUGHAN, S. et al. A Repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. **Protist**, v. 159, n. January, p. 127–136, 2008.
- WAGNER, S. et al. Rationalizing membrane protein overexpression. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 364–371, 2006.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.
- WHEELER, R. J.; SUNTER, J. D.; GULL, K. Flagellar pocket

restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 4, p. 854–867, 2016.

WOODS, K. et al. Identification and characterization of a ttage specific membrane protein involved in flagellar attachment in *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

ZHOU, Q. et al. A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 3848–3858, 2011.

ZHOU, Q. et al. Assembly and maintenance of the flagellum attachment zone filament in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 13, p. 2361–2372, 2015.

ZHOU, Q.; HU, H.; LI, Z. New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in Trypanosomes. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 308, p. 127–166, 2014.

Apêndice A - Proteínas da FAZ de *Trypanosoma brucei*.

Características das proteínas da FAZ de *T. brucei*.

<i>T. brucei</i>									
Proteína	Número de Acesso	pb	aa	Peso Molecular Previsto (kDa)	p.I.	Pept. Sinal	Dom. Trans m.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLA1	Tb927.8.4010	1641	546	58,46	5,34	Sim	Sim	NHL	cl18310
FLA2	Tb927.8.4060	1773	590	64,41	4,94	Sim	Sim	NHL	cl18310
FLA3	Tb927.8.4110	1773	590	64,25	4,92	Sim	Sim	NHL	cl18310
FLA1BP	Tb927.8.4050	2253	750	83,06	4,83	Não	Sim	-	-
	Tb927.8.4100	2253	750	83,06	4,83	Não	Sim	-	-
FLA3	Tb927.5.4570	2457	818	88,87	5,52	Sim	Sim	NHL	cl18310
	Tb927.5.4580	2457	818	88,63	5,95	Sim	Sim	NHL	cl18310

<i>T. brucei</i>									
Proteína	Número de Acesso	pb	aa	Peso Molecular Previsto (kDa)	p.I.	Pept. Sinal	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
Canal ²⁺ Ca	Tb927.10.2880	8082	2693	303,77	8,84	Não	Sim	Transportador de Íon	pfam00520
FAZ5	Tb927.10.8830	1858	585	66,66	4,78	Não	Sim	Chaperona	PTZ00037
FAZ9	Tb927.10.14320	3402	1133	121,80	7,14	Sim	Não	Remetidos ARM	cl25709
FAZ2	Tb927.1.4310	4819	1638	183,76	9,4	Não	Não	-	-
FAZ3	Tb927.11.12530	2421	806	90,65	8,56	Sim	Não	-	-
FAZ12	Tb927.11.2590	3246	1081	121,14	6,89	Não	Não	-	-
FAZ13	Tb927.3.1020	1482	493	543,34	5,14	Não	Não	-	-
FAZ14	Tb927.8.6980	2502	833	95,06	7,15	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>									
Proteína	Número de Acesso	pb	aa	Peso Molecular Previsto (kDa)	p.I.	Pept. Sinal	Dom. Trans m.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ8	Tb927.4.2060	1761	586	68,83	4,74	Não	Não	-	-
FAZ1	Tb927.4.3740	5079	1692	192,57	4,32	Não	Não	-	-
CC2D	Tb927.4.2080	2721	906	104,88	5,79	Não	Não	C2	smart0023 9
FAZ4	Tb927.9.10530	3132	1043	118,71	5,84	Não	Não	-	-
FAZ6	Tb927.10.840	5160	1719	195,48	5,9	Não	Não	WD	cl25539
FAZ7	Tb927.10.15390	3288	1095	123,56	9,46	Não	Não	Kinesina	cl22853
TbVAP	Tb927.11.13230	651	216	23,91	9,56	Não	Sim	MSP	cl27657
TbSAS4	Tb927.11.3300	2799	932	107,86	8,92	Não	Não	Tcp10	cl06299
TOEFAZ1	Tb927.11.15800	2382	793	89,58	8,73	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>									
Proteína	Número de Acesso	pb	aa	Peso Molecular Previsto (kDa)	p.I.	Pept. Sinal	Dom. Trans m.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
ClpGM6	Tb927.11.1090	17514	5837	663,06	4,44	Não	Não	Calpain	cl00051
FLAM3	Tb927.8.4780	12456	4151	468,13	5,01	Não	Não	Clu	cl16180
KMP11	Tb927.9.13820	279	92	11,08	6,53	Não	Não	KMP11	pfam0303 ₇
	Tb927.9.13880	279	92	11,08	6,53	Não	Não	KMP11	pfam0303 ₇
	Tb927.9.13920	279	92	11,08	6,53	Não	Não	KMP11	pfam0303 ₇
FAZ10	Tb927.7.3330	13005	4334	502,65	4,27	Não	Não	-	-
FAZ11	Tb927.4.5340	2508	835	94,70	7,13	Não	Não	-	-
FAZ15	Tb927.8.7070	951	316	35,43	6,8	Não	Não	-	-
FAZ16	Tb927.5.3460	1614	537	57,44	4,79	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>									
Proteína	Número de Acesso	pb	aa	Peso Molecular Previsto (kDa)	p.I.	Pept. Sinal	Dom. Trans m.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ17	Tb927.10 .7210	687	228	26,25	9,45	Não	Sim	-	-

Apêndice B - Proteínas da FAZ de *Trypanosoma cruzi*.

Resultado da busca por proteínas ortólogas as proteínas da FAZ de *T. brucei* na cepa CL-Brener de *T. cruzi* no banco de dados do TriTypDB.

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLA1	EL	TcCLB. 503571.10	43,04	Sim	1746	581	62,58	6,59	Sim	Sim	NHL	cl18310
	NEL	TcCLB. 509561.20	43,22	Sim	1740	579	62,27	5,96	Sim	Sim	NHL	cl18310
FLA2	EL	TcCLB. 503571.10	42,85	Sim	1746	581	62,58	6,59	Sim	Sim	NHL	cl18310
	NEL	TcCLB. 509561.20	43	Sim	1740	579	62,27	5,96	Sim	Sim	NHL	cl18310
FLA3	EL	TcCLB. 503571.10	43,02	Sim	1746	581	62,58	6,59	Sim	Sim	NHL	cl18310
	NEL	TcCLB. 509561.20	43,35	Sim	1740	579	62,27	5,96	Sim	Sim	NHL	cl18310

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLA1BP	EL	TcCLB. 503571.19	37,42	Sim	2126	708	79,25	4,98	Sim	Sim	-	-
	NEL	TcCLB. 509561.9	34,42	Sim	1100	366	40,65	5,19	Sim	Sim	-	-
FLA1BP	EL	TcCLB. 503571.19	37,42	Sim	2126	708	79248	4,98	Sim	Sim	-	-
	NEL	TcCLB. 509561.9	34,42	Sim	1100	366	40,65	5,19	Sim	Sim	-	-
FLA3	EL	TcCLB. 503571.19	36,58	Não	2126	708	79248	4,98	Sim	Sim	-	-
	NEL	TcCLB. 509561.9	33,6	Não	1100	366	40,65	5,19	Sim	Sim	-	-
FLA3	EL	TcCLB. 503571.19	37,71	Não	2126	708	79248	4,98	Sim	Sim	-	-
	NEL	TcCLB. 509561.9	34,42	Não	1100	366	40,65	5,19	Sim	Sim	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
Canal Ca ²⁺	NEL	TcCLB. 504105.130	52,91	Sim	8178	2725	307,29	8,36	Não	Sim	Transportador de Íon	pfam00520
FAZ5	EL	TcCLB. 508723.24	41,68	Sim	1680	559	63,22	4,77	Não	Sim	Chaperona	PTZ00037
	NEL	TcCLB. 509791.60	41,68	Sim	1680	559	63,24	4,78	Não	Sim	Chaperona	PTZ00037
FAZ9	NEL	TcCLB. 511283.160	65,65	Sim	3261	1086	117,52	6,59	Não	Não	Repetições ARM	pfam00514
	EL	TcCLB. 506527.4	53,45	Sim	1431	477	52,13	5,85	Não	Não	-	-
FAZ2	NEL	TcCLB. 510885.160	45,49	Sim	4263	1420	160,92	7,31	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ2	EL	TcCLB. 506529.250	45,22	Sim	4275	1424	161,5	7,15	Não	Não	-	-
FAZ3	EL	TcCLB. 508777.30	64,28	Sim	2397	798	90,51	7,91	Não	Não	-	-
	NEL	TcCLB. 509029.60	63,9	Sim	2397	798	90,63	7,87	Não	Não	-	-
FAZ12	EL	TcCLB. 504153.260	37,04	Sim	2886	961	108,7	6,52	Não	Não	-	-
FAZ14	EL	TcCLB. 504835.29	27,96	Sim	1997	665	75,86	9,36	Não	Não	-	-
	NEL	TcCLB. 509911.130	27,77	Sim	2217	738	83,31	8,74	Não	Não	-	-
FAZ8	EL	TcCLB. 510877.20	63,05	Sim	1749	582	67,51	4,81	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintê nico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Tran sm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ1	EL	TcCLB. 509631.140	60,42	Sim	4754	1587	181,98	4,36	Não	Não	-	-
CC2D	NEL	TcCLB. 506559.550	52,2	Sim	2805	934	108,75	5,63	Não	Não	C2	smart0 0239
FAZ4	EL	TcCLB. 506147.110	32,59	Sim	3207	1068	111,68	5,31	Não	Não	-	-
	NEL	TcCLB. 510735.90	32,5	Sim	3207	1068	122,7	5,35	Não	Não	-	-
FAZ6	EL	TcCLB. 503479.40	30,34	Sim	3651	1216	138,78	6,67	Não	Não	WD	cd0020 0
	NEL	TcCLB. 506855.190	31,43	Sim	3066	1021	115,38	6,62	Não	Não	WD	cl2553 9

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ7	EL	TcCLB. 506503.90	46,11	Sim	3513	1170	134,35	9,19	Não	Não	Kinesina	cl22853
	NEL	TcCLB. 511293.50	46,93	Sim	3513	1170	134,4	9,11	Não	Não	Kinesina	cl22853
TbVAP	EL	TcCLB. 503819.10	33,33	Sim	705	234	26,28	9,42	Não	Sim	MSP	cl27657
	NEL	TcCLB. 510359.330	33,33	Sim	705	234	26,27	9,42	Não	Sim	MSP	cl27657
TbSAS4	EL	TcCLB. 509589.50	54,22	Sim	2382	793	92,5	9,23	Não	Não	Tcp10	pfam07202
	NEL	TcCLB. 503999.40	54,25	Sim	2331	776	90,45	9,76	Não	Não	Tcp10	pfam07202
TOEFA Z1	EL	TcCLB. 511545.140	28,27	Não	1860	619	67,58	8,18	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
TOEFA Z1	NEL	TcCLB. 506819.49	24,3	Não	545	181	19,54	8,75	Não	Não	-	-
ClpGM6	NEL	TcCLB. 506721.30	40,56	Sim	13716	4571	519,34	5,01	Não	Não	Calpain	cl00165
	EL	TcCLB. 504107.10	69,61	Sim	1728	576	65,52	5,46	Não	Não	Calpain	cl00165
	EL	TcCLB. 506925.550	37,91	Sim	4653	1551	167,62	7,8	Não	Não	Calpain	cl00165
	EL	TcCLB. 509013.19	64,57	Sim	3582	1194	135,49	5,17	Não	Não	Calpain	cl00051
FLAM3	EL	TcCLB. 508837.80	49,32	Sim	11487	3828	436,03	5,04	Não	Não	Clu	cl16180
	NEL	TcCLB. 511383.89	56,77	Sim	6464	2154	247,83	5,94	Não	Não	Clu	cl16180
	EL	TcCLB. 508837.90	42,06	Não	2121	706	80,36	7,68	Não	Não	Clu	cl16180

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brenner	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLAM3	NEL	TcCLB. 511383.80	41,5	Não	2121	706	80,49	7,57	Não	Não	Clu	cl16180
KMP11	EL	TcCLB. 510755.89	94,56	Sim	279	92	11,01	6,36	Não	Não	KMP11	pfam03037
	EL	TcCLB. 510755.98	94,65	Sim	276	91	10,88	6,01	Não	Não	KMP11	pfam03037
	NEL	TcCLB. 508413.68	94,5	Sim	276	91	10,88	6,01	Não	Não	KMP11	pfam03037
	NEL	TcCLB. 508413.76	94,5	Sim	276	91	10,88	6,01	Não	Não	KMP11	pfam03037
	NEL	TcCLB. 508413.84	93,42	Sim	228	76	9,18	6,26	Não	Não	KMP11	cl03852
FAZ10	EL	TcCLB. 510533.210	28,07	Sim	9297	3099	338,42	4,34	Não	Não	-	-
	NEL	TcCLB. 511823.14	32,86	Sim	3388	1129	132,11	4,37	Não	Não	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>											
Prot.	L. CL Brener	Núm. de Acesso	Id. (%)	Sintênico	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ11	EL	TcCLB. 504835.29	28,12	Não	1997	665	75,86	9,36	Não	Não	-	-
	NEL	TcCLB. 509911.130	27,5	Não	2217	738	83,31	8,74	Não	Não	-	-
FAZ15	NEL	TcCLB. 509911.40	23,41	Não	1029	342	38,01	6,92	Não	Não	-	-
FAZ16	EL	TcCLB. 503529.30	27,8	Sim	1578	525	58	6,65	Não	Não	LysM	cd0011 ₈
	NEL	TcCLB. 511647.70	27,25	Sim	1566	521	57,68	6,83	Não	Não	LysM	cd0011 ₈
FAZ17	EL	TcCLB. 509537.70	40,78	Sim	741	246	27,51	7,13	Não	Não	-	-

Apêndice C - Proteínas da FAZ de *Trypanosoma rangeli*.

Resultado da busca por proteínas ortólogas as proteínas da FAZ de *T. brucei* na cepa SC58 de *T. rangeli* no banco de dados do TriTypDB e do Laboratório de Protozoologia - UFSC.

<i>T. brucei</i>	<i>T. rangeli</i>										
Prot.	Núm. de Acesso	Banco de Dados	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Id. (%)	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLA1	TcRangeli-21_4 5222_46946	Lab. Proto	1725	574	62,49	5,42	Sim	Sim	43,22	NHL	cl183 10
FLA2	TcRangeli-21_4 5222_46946	Lab. Proto	1725	574	62,49	5,42	Sim	Sim	42,85	NHL	cl183 10
FLA3	TcRangeli-21_4 5222_46946	Lab. Proto	1725	574	62,49	5,42	Sim	Sim	43,72	NHL	cl183 10
FLA1 BP	TcRangeli-21_4 1580_43793	Lab. Proto	2214	737	80,5	5,12	Sim	Sim	35,82	-	-
FLA1 BP	TcRangeli-21_4 1580_43793	Lab. Proto	2214	737	80,5	5,12	Sim	Sim	35,82	-	-
FLA3	TcRangeli-21_4 1580_43793	Lab. Proto	2214	737	80,5	5,12	Sim	Sim	35,54	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. rangeli</i>										
Prot.	Núm. de Acesso	Banco de Dados	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Id. (%)	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FLA3	TcRangeli-21_4 1580_43793	Lab. Proto	2214	737	80,5	5,12	Sim	Sim	36,36	-	-
Canal Ca2+	TcRangeli-44_8 5317_93191	Lab. Proto	7875	2624	297,27	8,65	Não	Sim	52,82	Transportador de Íon	pfam00520
FAZ5	TRSC58_06017	TriTryp	1710	569	64,3	4,73	Não	Sim	43,4	Chaperona	PTZ00037
FAZ9	TRSC58_04791	TriTryp	3273	1090	117,58	6,87	Não	Não	62,29	Repetições ARM	pfam00514
FAZ2	TRSC58_05693	TriTryp	4038	1345	152,08	7,25	Não	Não	42,45	-	-
FAZ3	TRSC58_04002	TriTryp	2373	790	89,7	8,3	Não	Não	64,94	-	-
FAZ12	TRSC58_04978	TriTryp	2880	959	108,66	6,43	Não	Não	35,34	-	-

<i>T. brucei</i>	<i>T. rangeli</i>										
Prot.	Núm. de Acesso	Banco de Dados	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Id. (%)	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
FAZ13	TRSC58_00015	TriTryp	1899	632	68,94	6,73	Não	Não	27,58	-	-
FAZ14	TRSC58_02099	TriTryp	2190	729	81,31	8,76	Não	Não	27,57	-	-
FAZ8	TRSC58_03052	TriTryp	1749	582	66,99	4,83	Não	Não	62,37	-	-
FAZ1	TcRangeli-42_78365_81548	Lab. Proto	3184	1061	122,16	4,91	Não	Não	55,79	-	-
CC2D	TRSC58_00409	TriTryp	2814	937	109,1	5,63	Não	Não	52,64	C2	smart00239
FAZ4	TcRangeli-1_660143_662721	Lab. Proto	2579	858	98,59	6,77	Não	Não	36,71	-	-
FAZ6	TRSC58_02173	TriTryp	2229	742	84,12	10,01	Não	Não	35,86	WD	cl25539
FAZ7	TRSC58_05492	TriTryp	3525	1174	79,25	4,98	Sim	Sim	45,57	Kinesi na	cl22853

<i>T. brucei</i>	<i>T. rangeli</i>										
Prot.	Núm. de Acesso	Banco de Dados	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Id. (%)	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
TbVAP	TRSC58_02051	TriTryp	714	237	25,98	9,94	Não	Sim	35,18	MSP	cl27657
TbSA S4	TcRangeli-54_42335_44950	Lab. Proto	2616	871	100,8	8,93	Não	Não	50,63	Tcp10	cl06299
TOEF AZ1	TcRangeli-2_525979_527910	Lab. Proto	1932	643	69,41	7,9	Não	Não	27,83	-	-
ClpG M6	TRSC58_07069	TriTryp	1638	545	62,83	6,17	Não	Não	70,27	Calpain	cl00051
FLAM3	TcRangeli-88_54251_59194	Lab. Proto	4943	1647	189,12	5,94	Não	Não	54,09	Clu	cl15102
KMP11	TRSC58_02226	TriTryp	279	92	11,05	6,36	Não	Não	92,39	KMP11	pfam03037
	TRSC58_06460	TriTryp	279	92	11,05	6,36	Não	Não	92,39	KMP11	pfam03037
	TRSC58_01820	TriTryp	279	92	11,07	6,36	Não	Não	91,3	KMP11	cl03852

<i>T. brucei</i>	<i>T. rangeli</i>										
Prot.	Núm. de Acesso	Banco de Dados	pb	aa	Peso Mol. (kDa)	p.I.	Pept. Sin.	Dom. Transm.	Id. (%)	Dom. Cons.	Cód. do Dom.
KMP11	TRSC58_06679	TriTryp	279	92	11,07	6,36	Não	Não	91,3	KMP11	cl03852
FAZ11	TRSC58_02099	TriTryp	2190	729	81,31	8,76	Não	Não	27,16	-	-
FAZ15	TcRangeli-46_112235_113263	Lab. Proto	1029	342	36,3	6,26	Não	Não	22,15	-	-
FAZ16	TRSC58_00084	TriTryp	1599	532	57,58	6,75	Não	Não	27,06	LysM	cd00118
FAZ17	TRSC58_06118	Lab. Proto	738	245	27,08	8,93	Não	Não	32,43	-	-
	TcRangeli-34_55309_55755	Lab. Proto	446	148	16,21	11,46	Não	Não	32,43	-	-

Apêndice D – Predição dos sítios de glicosilação de *TcFla3*, *TrFla3*, *TbFla3* e *TbFla1BP*.

Predição dos sítios de N-glicosilação das proteínas *TrFla3* (A), *TcFla3* (B), *TbFla3* (C) e *TbFla1BP* (D) utilizando o programa NetNGlyc 1.0 Server.

A) Name: T_rangoli Length: 737

NR1LLGALLTISVSLIAATLEMAAAMPRLRMVETVSGVSGVIGADVGGRGKSLLRPLALCQGRNEDEILIGMEGFPR 80

YRSRFTQCTGLCGAADVDGLNANVRKPGACVCTLRNNQGVYFVESQNRRLRYTHHSILSIQLEKGAFTDALY 160

GDRLYMTENQKNDVMSQCIQMDQCTNRPDCEKCEYTKNGIYAVNRLVFTGVGGSSQTQICHPDSRGTNIHLPGOYS 240

DVFSVPSGVLNVMSSQQLYHLHVAGSSMTVDLPAQNSRLTCCPVVDGYAFVTCNSNRLPLVAENEMILSDHLSTRAVAT 320

PPAIVPAQLPPSPPLGYPDAQGVMEIVALNKKLNRKLTSTAYAPQNDHMLRSTVTDVTVLVDQGDFFVVTGPE 400

VATTFNFAAQVRATVAYDRIDEALYNDTSIFPFCANMGNAVMHELVSVVRKVLVEFLPIYANPPHVRITINGVANIRMKL 480

LMPEFPHSGLTETHMAELNANTALQDILRVETGAANVQVLGVFFPKDFSKIMPVDQMEVHRFIQNMVNAQLETCKSAFT 560

GDNIJAAGHIAAGNGIAAGDGAAGRDIAAGDGSCEAVTINRQCTVTVRPPFNVQNEYEVFVPHKYNFVSRCLGDI 640

DHGPVELLYLNYEAAITRHNPACNRCRIGIIVAVAAVLZLTAIVVVLTSKRKKRLAAVPAVPFKFSTLDDDDDEEME 720

TSNPLEANNEHALDRY 800

.....N..... 80

.....N..... 160

.....N..... 240

.....N..... 320

.....N..... 400

.....N..... 480

.....N..... 560

.....N..... 640

.....N..... 720

..... 800

B) Name: *T. cruzi* Length: 712

```
MSRRQRLFLAGFAGFLSFTASVVPAPLRYMVEVTSVSGITSGIHVNGVSGPTSLTRPSAICQGRNEDELLFTQGYFRN 80
FSRSTFQITGLILDGTAQILLDGTSQARIDGPRGCVRGIPQKMIWVVPVVGQSRLFTSVNVTHTTISILNPSFTDKVLY 160
EKKLYLTETQKDEWFGSDTADGAPVSCALGTFCVKYGIKTVKGLVGVGVSGASGICFDMGMKIGNISVLGNGYID 240
VFSLSPEDELYIMSZYELHLRVIGSAMVSGFKAGRSDATCPPLTDGYDFGLCKMLRLPVIQSESLTLATTLNTRVSVTLP 320
PAIWIWELPPPLPIGYPNNDNEVMKKIQLQNGEELNKKHGLNGOTVTSQETHVDANTHATKFAVMVQQQDFNATTPGEV 400
LTZHTFRTTQKQVYDRVNEVLTMDTSMPCFNDTLM.NAVMHRILVSVVRELSFPLIYANPEVPRKEFENITMKLL 480
MPASPNDDTREALMDMDAALLQLRLRELYGEHVLTLPMPKQYDFSKLTDQLEWVEVRMFLDLVRARLECFAECVALSD 560
GVGASVSSHSCEVCAITNRTETVSPFPNIGSEYEVVPSPRYKNASLCLDGDIAWVLEELIKNTTEKNPRHSACD 640
RSCITGLAVLAAALVLTALIAVMVLTLSKRRRLAAVAPVHPKIKSTLDEDEEMETTNPLEVKDEQRARDNY
```

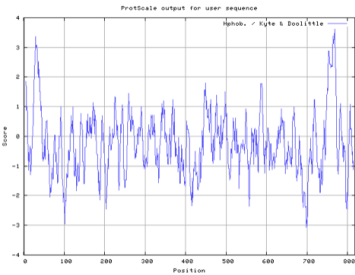
..... 800
..... 860
..... 920
..... 980
..... 1040
..... 1100
..... 1160
..... 1220

C)	Name: Tb_Fla3 Length: 818	
	MCFIFGVEMSNLAKRPHSLRKLPLQLLLIMIGIAFVAVECIGAPVKLPRVDTVAGQFGEVETNGYPNTRLTEPYALC RGRTNDEILVGSNSFRNYSRKTKETGYLYRNVGDSVISGSSTINKPRSCVRRGSGNHTIIFYVDDQDKIKYIVGDDVS SFSVPTSGSLNAVAVHEGZLIVTDQNKSVWKCLOGAGKPKQSCKEEKFTSVTLDAKPEGIAVTSKGIFVTARDSSKGA LLMLDMSGGRRKRNVGGGFVDFVFTSESGVLYAATKELYTTATDTSLSVTSFAGKNTGQCYFFTNGEDIVLCDNSRLIV JEEVEHYTSKAKHVRALZLPFVSLALIPGPRPAVGFPTTIDGQFVSLTEDVWALGZNSVVDGDSVVDPTWE TTFVTVQGTFRFDNTEKRLSLTYTQGDKTVDDEYLYGLTDEYVITDVLVPPFCDDASLVTIGRALAREAGRALFSLVYA DKPTTFPGSDVAENVAVKLLMPHSFKMATPKQLSAAHLDFAHNLVKDLRASDTRVDITFPDPPNFSAUVPEREGEVR WPFVHGVMKQLEICERLGSQSDAAVIAAADATARGKANVTLNTSGVKANDTGVGPNNTTAGGAHTTANVAANGTANVI VNFSTNATPTGTTNASVTNTERAVPVVAPTQPSNGYAECSAITNRTETQNHPEPPYDRKRYEVFLPKKYDFNVSCVD IIDWRDLDEMLNRTDEVVEKLSWCHGHCIIAFVAVGSLIAACLVLVLAVLTSKRRRLAAVAVPPRPKPFVSTVEDDDED RVSHIGVPLTDGKGTTAP	80 160 240 320 400 480 560 640 720 800
D)	Name: TbFla1BP Length: 750	
	MPLMKQNCCEVEVMVREVVGHVLYGYSQMLLVATVATIVVRSGAAPIELKRHVTTVAGKYGHIGDKDGFPGMSLSS PHAMSGRGRNSDEILLGTVDLRFRAFSRKKNRETTTAMETDEGKSGRSVKVDKPRACVQHTVGGSTFYFVFSMGVVKY FKDSCGVFSHDVRLNGSLTGVALYGNHLLETQNTNTVMTCEVGSQDPIACHSHVALSANCSYIGPIGIAATQGGIFVVA RGPAPKQGTICWFDLQGHKIAEVDQGEYVDITSTRSGDLLAATQNELHRVSTDGNKLTTRKFAAGGSTNCLPNTTEGDDTLIC EITRLVVVTEYEMVYTSKKSVLSRVLPVTVVQGLFPGRLPVGVPDKDIMEHIVGNLTEDINTALGTESIVASSSVH VDSTWLTNFTAGVQPPDFDDEKTEQALHESYENTKEAADEYHILDEQVYMDSTHVPYCNRLSLDALRRKLAKAGEV LNFPLIYADMPKASSSDAENITVTKLLMPASFNTVTHDLLSDANLETAHSPIKYLRSSDTHVDVTFPSNPPFPFSLT PDEEQEVRYHIDHEVMHQIKKCEERSTGRSMARREEVGDHSRTTIALDSNVGVCQSTITNRTVSLFYQPPVTVMESLY EVFIPGNFTFDVSECVGEIDWQDLNDELNDIVRPTEKAPKCGKVCILIIAUVCALIVAVLIVLVVFTSKRRRLAAV APAPKPFVSTLDEDEQQYASAGKKEVQ	80 160 240 320 400 480 560 640 720 800

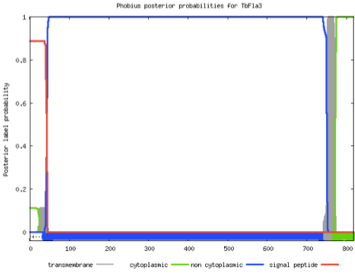
Apêndice E - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla3 de *Trypanosoma brucei*.

A) Predição da hidrofobicidade de Fla3 de *T. brucei* utilizando a ferramenta *ProtScale*. Pontuação acima de zero indica a hidrofobicidade do aminoácido. B) Predição da topologia transmembranar e do peptídeo sinal da Fla3 de *T. brucei* utilizando a ferramenta *Phobius prediction*.

A)



B)



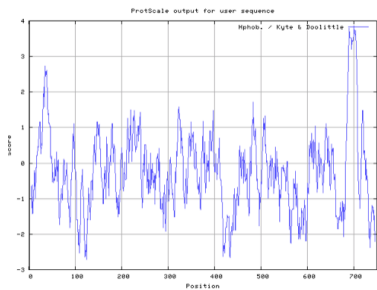
Prediction of TbFla3

ID	TbFla3		
FT	SIGNAL	1	40
FT	REGION	1	24
FT	REGION	25	36
FT	REGION	37	40
FT	TOPO_DOM	41	750
FT	TRANSMEM	751	772
FT	TOPO_DOM	773	818
//			

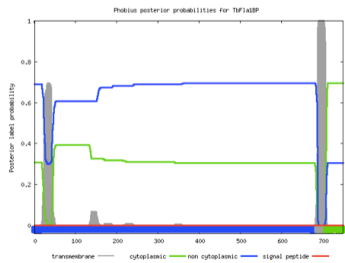
Apêndice F - Predição da hidrofobicidade e topologia transmembranar da Fla1BP de *Trypanosoma brucei*.

A) Predição da hidrofobicidade de Fla1BP de *T. brucei* utilizando a ferramenta *ProtScale*. Pontuação acima de zero indica a hidrofobicidade do aminoácido. B) Predição da topologia transmembranar e do peptídeo sinal da Fla1BP de *T. brucei* utilizando a ferramenta *Phobius prediction*.

A)



B)



Prediction of TFla1BP

```
ID TFla1BP
FT TONG_DOM 1 687 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 688 709
FT TONG_DOM 710 736 CYTOPLASMIC.
//
```